



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Regulación transcripcional y efecto metabólico de la silenciación génica de la glutamato deshidrogenasa en dorada (*Sparus aurata*)

Juan Carlos Gaspar Condori

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGIA

SECCIÓN DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y EFECTO
METABÓLICO DE LA SILENCIACIÓN GÉNICA
DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN
DORADA (*SPARUS AURATA*)**

Juan Carlos Gaspar Condori

2018



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGIA

SECCIÓN DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y EFECTO
METABÓLICO DE LA SILENCIACIÓN GÉNICA
DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN
DORADA (*SPARUS AURATA*)**

Memoria presentada por Juan Carlos Gaspar C. para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Barcelona

Director:

Autor:

Isidoro Metón Teijeiro

Juan Carlos Gaspar Condori

Barcelona, 2018

"The mind is not a vessel to be filled, but a fire to be kindled. "

Plutarch

*Dedico este trabajo de tesis a mi familia,
en especial a mi Madre, a mi Padre
y a mi hermana Luz.*

ABREVIATURAS

18s	subunidad 18s ribosomal
6PGDH	6-fosto-Gluconato deshidrogenasa
ADNc	ADN complementario
ADP	adenosina difosfato
ALT	alanina aminotransferasa
AMP	adenosina monofosfato
AMPK	proteína quinasa activada por AMP
AP	aceite de pescado
ARNm	ARN mensajero
AST	aspartato aminotransferasa
ATP	adenosina trifosfato
bHLH-LZ	helix-loop-helix-leucine zipper
CMV	citomegalovirus
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding protein</i>
ddNTP	didesoxinucleotido trifosfato
DE	desviación estándar
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiamina tetra acetato
EF-1	<i>elongation factor-1 alpha</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FAN	factores anti-nutricionales
FBPasa-1	fructosa-1,6-bifosfatasa
Foxo	<i>forkhead box</i>
fru-2,6P ₂	fructosa-2,6-bifosfato
G6Pasa	glucosa-6-fosfatasa
G6PDH	glucosa-6-fostato deshidrogenasa
GDH	glutamato deshidrogenasa
GK	glucoquinasa
GLUT	transportador de glucosa
GPDH	glicerol 3-fosfato deshidrogenasa
GTP	guanosín trifosfato
HP	harina de pescado
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
Inr	iniciador
IRS	substrato del receptor de la insulina
K _m	constante de Michaelis-Menten
LB	medio de cultivo Luria-Bertrani

LDH	lactato deshidrogenasa
Luc	gen de la luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>
MBS	sitio de unión de MYB
MDH	malato deshidrogenasa
NAD ⁺	dinucleótido de nicotinamida y adenina
OGDH	α -cetoglutarato deshidrogenasa
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galactopyranoside
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	fosfoenol piruvato carboxiquinasa
PFK-1	fosfofructoquinasa-1
PFKFB1	fosfofructoquinasa-2/fructosa-2,6-bifosfatasa
PGI	6-fosfato isomerasa
PK	piruvato quinasa
PPA	proteínas procesadas de animales
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PV	pienso vegetal
RACE	amplificación rápida de extremos de ADNc
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RT	transcriptasa inversa o retrotranscriptasa
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SD	serina deshidratasa
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS
sh-ARN	<i>short hairpin</i> ARN
SIRT	Sirtuína
SP1	<i>specific protein 1</i>
SRC-1	<i>steroid receptor coactivator 1</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
Stat	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
STZ	estreptozotocina
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetrametiletilendiamina
TFIIB	<i>transcription factor II B</i>
T _m	temperatura de melting
TOR	<i>target of rapamycin</i>
TPI	triosa fosfato isomerasa
TPP	tripolifosfato
USF	<i>upstream stimulatory factor</i>

ÍNDICE

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	21
<i>1.1 DESARROLLO DE LA ACUICULTURA Y CRECIMIENTO DE LA POBLACIÓN MUNDIAL.....</i>	<i>23</i>
<i>1.2 HACIA UNA ACUICULTURA SOSTENIBLE</i>	<i>26</i>
<i>1.3 METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS EN LOS PECES.....</i>	<i>28</i>
<i>1.3.1 Intolerancia a la glucosa en peces carnívoros.....</i>	<i>29</i>
<i>1.3.2 Homeostasis de la glucosa en peces carnívoros.....</i>	<i>30</i>
<i>1.4 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN PECES.....</i>	<i>33</i>
<i>1.4.1 Catabolismo de los aminoácidos en peces.....</i>	<i>34</i>
<i>1.4.2 Gluconeogénesis a partir de aminoácidos en peces.....</i>	<i>37</i>
<i>1.4.3 Importancia del glutamato en el metabolismo de proteínas.....</i>	<i>38</i>
<i>1.4.4 Papel de la GDH en la transaminación, desaminación y excreción de amonio.....</i>	<i>38</i>
<i>1.5 GLUTAMATO DESHIDROGENASA</i>	<i>40</i>
<i>1.5.1 Localización intracelular de GDH.....</i>	<i>41</i>
<i>1.5.2 Múltiples formas de GDH.....</i>	<i>41</i>
<i>1.5.3 Estudios estructurales del GDH.....</i>	<i>42</i>
<i>1.5.4 Características cinéticas de la GDH.....</i>	<i>44</i>
<i>1.5.5 Regulación de la GDH.....</i>	<i>45</i>
<i>1.5.6 Modificaciones post-traduccionales de GDH</i>	<i>45</i>
<i>1.5.6.1 ADP-ribosilación dependiente de NAD⁺.....</i>	<i>45</i>
<i>1.5.6.2 Fosforilación</i>	<i>46</i>
<i>1.5.6.3 Acilación de lisina y cisteína</i>	<i>46</i>
<i>1.5.7 Regulación transcripcional</i>	<i>48</i>
<i>1.6 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN USF.....</i>	<i>49</i>
<i>1.6.1 Estructura de USF-1 y USF-2 e interacción con otras proteínas</i>	<i>50</i>
<i>1.6.2 PROPIEDADES DE UNIÓN AL ADN.....</i>	<i>52</i>
<i>1.6.3 Expresión de USF.....</i>	<i>53</i>
<i>1.6.4 USF en el metabolismo de glúcidos-lípidos</i>	<i>54</i>

1.6.4.1	USF durante el ciclo de alimentación y ayuno	55
1.7	FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN MYB	57
1.7.1	<i>Estructura de la familia de proteínas MYB</i>	57
1.7.2	<i>MYB: Regulador de expresión de genes</i>	59
1.7.3	<i>MYB en metabolismo celular</i>	60
2.	OBJETIVOS	61
2.1	OBJETIVO GENERAL	63
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	63
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.1	LA DORADA	67
3.1.1	<i>Manipulación de los animales y toma de muestras</i>	67
3.1.1.1	Obtención de extractos hepáticos	69
3.2	ELABORACIÓN DE DIETAS SEGÚN EL DISEÑO EXPERIMENTAL	69
3.2.1	<i>Experimento 1: Regulación nutricional de la expresión de GDH</i>	69
3.2.2	<i>Experimento 2: Efecto metabólico del silenciamiento génico de GDH</i>	71
3.3	LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS	72
3.3.1	<i>Lista de oligonucleótidos</i>	72
3.3.2	<i>Lista de plásmidos</i>	73
3.4	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	76
3.5	PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	77
3.6	ELECTROFORESIS DE ADN	77
3.7	DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE ADN	78
3.8	CONVERSIÓN DE EXTREMOS DE ADN PROTUBERANTES EN ROMOS	79
3.9	LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	80
3.10	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	80
3.10.1	<i>Obtención de células E. coli competentes</i>	80
3.10.2	<i>Transformación por shock térmico</i>	81
3.11	OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO	82
3.12	SECUENCIACIÓN DEL ADN	82

3.13	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	83
3.14	PCR COLONIA	83
3.15	PASEO CROMOSÓMICO (“GENOME WALKER”).....	83
3.15.1	Construcción de las librerías Genome Walker	84
3.15.2	Purificación del DNA	84
3.15.3	Ligación del ADN genómico a los adaptadores Genome Walker	85
3.15.4	PCR	85
3.16	AMPLIFICACIÓN DE EXTREMOS DE ADNc POR RACE: RLM-RACE	86
3.16.1	Amplificación rápida de los extremos 5’ del ADNc.....	86
3.16.2	Amplificación rápida de los extremos 3’ del ADNc.....	87
3.16.3	Diseño de oligonucleótidos.....	87
3.16.4	Amplificación primaria para el RACE 5’ y 3’	87
3.16.5	Amplificación secundaria para el RACE 5’ y 3’	88
3.17	TRANSCRIPCIÓN INVERSA	89
3.18	RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-PCR).....	89
3.18.1	Curva de disociación de oligonucleótidos	91
3.18.2	Curva de concentración.....	91
3.19	WESTERN BLOT	91
3.19.1	Electroforesis de proteínas	91
3.19.1.1	Preparación de las muestras.....	92
3.19.1.2	Preparación de geles de poliacrilamida	92
3.19.1.3	Proceso de electroforesis.....	93
3.19.2	Transferencia de proteína a membrana.....	94
3.19.2.1	Visualización de las muestras en geles de poliacrilamida	94
3.19.3	Bloqueo de la membrana.....	95
3.19.4	Inmunodetección	95
3.19.4.1	Anticuerpos utilizados.....	96
3.20	ENSAYO DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA EN GEL (UNIÓN ADN- PROTEÍNA).....	96
3.20.1	Obtención de extractos nucleares.....	97
3.20.2	Preparación de oligonucleótidos marcados	97

3.20.2.1	Obtención de oligonucleótidos de doble cadena.....	97
3.20.2.2	Marcaje de fragmentos de ADN con DIG-ddUTP.....	98
3.20.2.3	<i>Dot Blot</i>	98
3.20.3	<i>Reacción de interacción proteína-ADN marcado</i>	98
3.20.4	<i>Transferencia y fijación a la membrana</i>	100
3.20.5	<i>Inmunodetección</i>	100
3.21	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD	101
3.22	INICIO, MANTENIMIENTO Y CONGELACIÓN DEL CULTIVO CELULAR	102
3.22.1	<i>Línea celular utilizada</i>	102
3.22.2	<i>Medios y reactivos empleados</i>	102
3.22.3	<i>Inicio del cultivo celular</i>	102
3.22.4	<i>Mantenimiento de los cultivos celulares: Tripsinización</i>	103
3.22.5	<i>Congelación de células</i>	103
3.23	TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS	103
3.23.1	<i>Transfección mediante el método de fosfato cálcico</i>	104
3.24	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL	104
3.24.1	<i>Recolección de células</i>	104
3.24.2	<i>Ensayo de la actividad β-galactosidasa</i>	105
3.24.3	<i>Ensayo de la actividad luciferasa</i>	105
3.24.4	<i>Análisis de los resultados</i>	105
3.25	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GDH	106
3.25.1	<i>Determinación de la actividad GDH (dirección de oxidación de NADH)</i>	106
3.25.2	<i>Determinación de la actividad GDH (dirección de reducción de NAD⁺)</i>	107
3.26	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALT	107
3.27	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AST	108
3.28	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PK	108
3.29	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PFK-I	109
3.30	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD 6PGDH	110
3.31	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD G6PDH	111
3.32	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FBPASA-I	112

3.33	<i>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD IDH</i>	113
3.34	<i>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD OGDH</i>	114
3.35	<i>DETERMINACIÓN DE GLUCOSA SÉRICA</i>	115
3.36	<i>DETERMINACIÓN DE ALFA-CETOGLUTARATO</i>	115
3.36.1	<i>Obtención de extracto hepático para la determinación de metabolitos</i>	115
3.36.2	<i>Determinación de α-cetoglutarato</i>	116
3.37	<i>DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR HPLC</i>	116
3.37.1	<i>Preparación de la muestra</i>	116
3.37.2	<i>Análisis cuantitativo</i>	117
3.38	<i>PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ADN-QUITOSÁN-TPP</i>	117
3.39	<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	118
4.	RESULTADOS	119
4.1	<i>CLONACIÓN DEL ARNm DE GDH DE S. AURATA</i>	121
4.1.1	<i>Alineamiento múltiple y diagrama filogenético de GDH de S. aurata</i>	123
4.2	<i>CLONACIÓN DEL PROMOTOR DE GDH DE S. AURATA</i>	126
4.2.1	<i>Caracterización del promotor de GDH de S. aurata</i>	127
4.7	<i>REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE GDH POR USF2</i>	130
4.7.1	<i>Activación del promotor de GDH por USF2</i>	130
4.4.2	<i>USF2 se une al E-box en la posición -10 a -5</i>	131
4.4.3	<i>Mutaciones en el elemento E-box eliminan la transactivación producida por USF2</i>	133
4.5	<i>DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LA EXPRESIÓN GDH Y USF2 EN S. AURATA</i>	134
4.6	<i>REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA EXPRESIÓN DE GDH Y USF2 EN HÍGADO DE S. AURATA</i>	135
4.6.1	<i>Efecto del ayuno y la realimentación sobre la expresión de GDH y USF2</i>	135
4.6.2	<i>Efecto de la composición de la dieta sobre la expresión de GDH y USF2</i>	135
4.7	<i>PAPEL DE MYB EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GDH</i>	137
4.7.1	<i>Presencia de lugares putativos de unión de MYB al promotor del gen GDH de S. aurata</i>	137
4.7.2	<i>Activación del promotor de GDH por cMYB</i>	138
4.8	<i>SILENCIACIÓN GÉNICA DE GDH EN HÍGADO DE S. AURATA</i>	140

4.8.2	<i>Silenciamiento de la expresión de GDH de S. aurata mediante shARN in vitro</i>	140
4.8.2	<i>Silenciamiento de la expresión de GDH en hígado de S. aurata mediante sh-ARN</i>	142
4.9	EFFECTO DE LA SILENCIACIÓN DEL ARN^m DE GDH SOBRE LA ACTIVIDAD GDH EN HÍGADO DE S. AURATA	144
4.10	EFFECTO METABÓLICO DE LA SILENCIACIÓN GÉNICA DE GDH EN HÍGADO DE S. AURATA	146
4.10.1	<i>Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre la actividad de las transaminasas</i>	146
4.10.2	<i>Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre la gluc3lisis</i>	147
4.10.3	<i>Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre la gluconeog3nesis</i>	147
4.10.4	<i>Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre la v3a de las pentosas fosfato</i>	149
4.10.5	<i>Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre el ciclo del 3cido tricarb3x3lico</i>	149
4.10.6	<i>Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre la concentraci3n de glucosa y triglic3ridos en suero</i>	150
4.11	EFFECTO DE LA SILENCIACIÓN GÉNICA DE GDH SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMINOÁCIDOS EN HÍGADO DE S. AURATA	151
5.	DISCUSIÓN	153
5.1.	CARACTERIZACIÓN DEL ARN^m Y PROMOTOR DE GDH EN S. AURATA	155
5.1.1	<i>Alineaci3n de secuencia y an3lisis filogen3tico de GDH</i>	155
5.1.2	<i>Caracterizaci3n del promotor GDH y regulaci3n transcripcional por USF2</i>	156
5.1.3	<i>cMYB: Posible activador de la transcripci3n de GDH</i>	160
5.2	EFFECTO METABÓLICO DEL SILENCIAMIENTO HEPÁTICO DE GDH	161
6.	CONCLUSIONES	165
7.	REFERENCIAS	171
8.	ANEXOS	193

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DESARROLLO DE LA ACUICULTURA Y CRECIMIENTO DE LA POBLACIÓN MUNDIAL

En las últimas cinco décadas, la oferta mundial de pescado para consumo humano creció a un ritmo medio de una tasa anual del 3,2% superando la tasa de crecimiento de 1,6% de la población mundial. De hecho, desde 2001 al 2013 el consumo per cápita de pescado en el mundo aumentó un 22%, de 16,1 kg a 19,7 kg, alcanzando un nuevo récord de 20 kg en 2014. En términos globales, la contribución del consumo de pescado a la ingesta de proteínas animales en la población también está aumentando, alcanzando el 17% en 2013 (EUMOFA, 2016; FAO, 2016).

De 2013 a 2014 el consumo aparente de productos pesqueros en la Unión Europea (UE) aumentó 409.000 toneladas, llegando a casi 13 millones de toneladas. Esto representa un aumento del 3,5% del consumo medio per cápita de pescado en la UE, que alcanzó los 25,53 kg (EUMOFA, 2016). El aumento del consumo fue más significativo para los productos de la acuicultura, con un aumento del 6%, mientras que el consumo de pescado silvestre, pese a representar el 75% del consumo total, aumentó sólo un 2,7%. Sin embargo, el consumo per cápita de la UE es muy variable, desde 5 kg en Serbia y Albania hasta 90 kg (valores para 2014) en Islandia, que es la más alta del mundo. Para el mismo período el consumo per cápita de pescado en España alcanzó los 46,2 kilogramos, siendo el tercero más alto de la UE (EUMOFA, 2016; FAO, 2016). La dorada (*Sparus aurata*) es la especie de mayor producción acuícola en España y, entre los peces de origen marino, en Europa. En el 2013, la producción total de esta especie, cultivada fundamentalmente en área mediterránea, se cuantificó en 147 mil toneladas, aportando el 56% del total de la producción de peces marinos en Europa (Tabla 1) (FEAP, 2016).

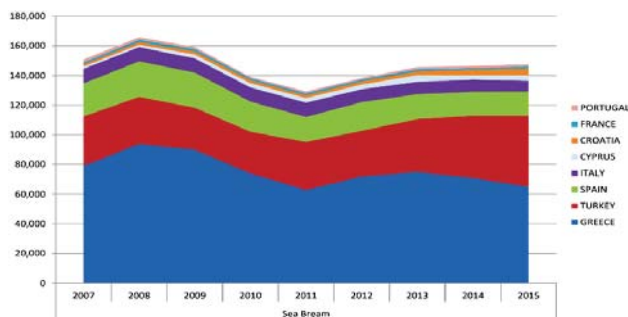


Figura 1.

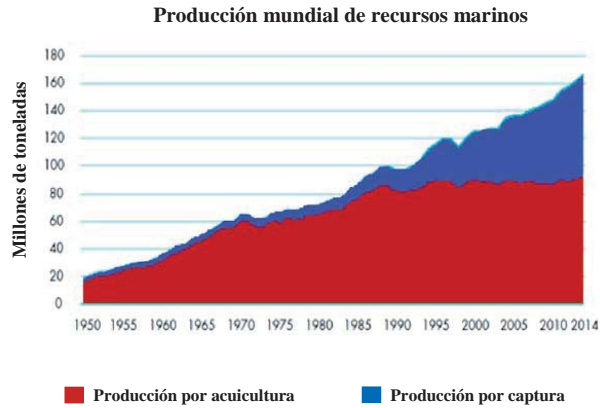
Producción acuícola de *Sparus aurata* en área mediterránea. Adaptado de FEAP (2016).

Se espera que el crecimiento continuo de la población mundial, la rápida urbanización y el aumento del nivel de vida, así como los avances tecnológicos en la elaboración, envasado y distribución de alimentos y el creciente reconocimiento del pescado como alimento nutritivo, apoyen el aumento continuo del consumo per cápita de pescado. De hecho, el pescado se considera cada vez más como un alimento nutritivo que debe incluirse en una dieta saludable debido a sus proteínas de alta calidad, con un perfil adecuado de aminoácidos, grasas esenciales (por ejemplo, ácidos grasos de cadena larga, omega-3), vitaminas (D, A y B) y minerales (incluyendo calcio, yodo, zinc, hierro y selenio) (FAO, 2015, 2016; EUMOFA, 2016).

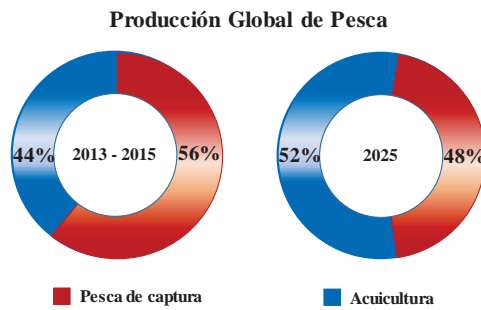
Con la producción de pesca de captura relativamente estática en 90-95 millones de toneladas desde mediados de los años noventa del siglo pasado, la demanda adicional de productos pesqueros ha sido satisfecha por la producción acuícola (Figura 2A). Se espera que esta tendencia continúe y se prevé que la acuicultura seguirá siendo el sector de mayor crecimiento para la producción de alimentos antes de 2025, a pesar de que se prevé una disminución de su tasa de crecimiento anual de 2,5% a 1,5% para 2025. Sin embargo, la participación de la acuicultura en la producción pesquera total crecerá del 44% en 2013-15 al 52% en 2025 (Figura 2B). Sin embargo, dado que casi todos los peces producidos a partir de la acuicultura se destinan al consumo humano, se prevé que la participación de la acuicultura en el consumo mundial de pescado aumentará del 50% en 2013-2015 al 57% en 2025 (Figura 2C). Además, es importante señalar que la participación de la producción acuícola varía ampliamente entre los continentes, representando sólo el 18% de la producción total de peces en Europa en 2014 (FAO, 2016).

Las Naciones Unidas estiman que la población mundial alcance la cifra de 8,5 mil millones en 2030 y 9,7 mil millones en 2050. En un contexto de cambio climático, incertidumbre económica, financiera y limitados recursos naturales, alimentar a 9,7 mil millones de personas en 2050 es considerado uno de los mayores desafíos del siglo XXI y motivó a los estados miembros de las Naciones Unidas, el 25 de septiembre de 2015, a adoptar el Programa 2030 para el Desarrollo Sostenible y los Objetivos de Desarrollo Sostenible (SDGs). Entre otros objetivos, esta agenda tiene como finalidad, asegurar el desarrollo sostenible de la pesca y la acuicultura en términos sociales, económicos y ambientales. (FAO, 2016).

A.



B.



C.

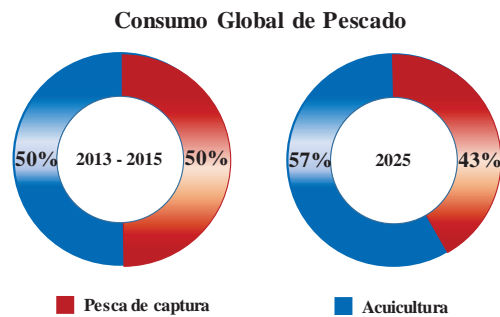


Figura 2. Evolución de la acuicultura: situación actual, tendencias y perspectivas futuras. A: Pesca mundial y producción acuícola; B: La acuicultura y la pesca de captura relacionadas con la producción mundial; C: Participación relativa de la acuicultura y la pesca de captura en el consumo mundial. Imagen adaptado de la FAO (2016).

1.2 HACIA UNA ACUICULTURA SOSTENIBLE

La harina de pescado (HP) y el aceite de pescado (AP) aún se consideran los ingredientes más nutritivamente equilibrados para los peces carnívoros, debido a su alta palatabilidad, digestibilidad, niveles de ácidos grasos poliinsaturados y perfil de aminoácidos. Sin embargo, con la disminución progresiva de la producción y la subida de los precios de dichos productos básicos, se ha vuelto imperativo encontrar fuentes de proteínas y lípidos más asequibles y sostenibles para reemplazar parcial o totalmente la harina de pescado y el aceite de pescado (Oliva-Teles, Enes and Peres, 2015). En ese proceso, HP y AP se han convertido en ingredientes estratégicos, siendo incluidos en altas concentraciones sólo en etapas de producciones específicas (por ejemplo, alimentación de reproductores y al inicio y final de la producción acuícola) (ARRAINA, 2016). Estos cambios en la formulación de la dieta no producen una adaptación adecuada en peces carnívoros, comparados con otros animales, debido a que estos peces tienen mayor requerimiento de proteínas y aminoácidos, ya que son más dependientes de la proteína dietética en lugar de glucosa o lípidos para satisfacer sus necesidades metabólicas (Halver and Hardy, 2002).

La proteína es el componente más caro del pienso, lo que justifica la gran cantidad de investigaciones centradas en reducir la dependencia insostenible de la HP que cada vez es más costosa. En la última década se lograron algunos avances en la reducción de la dependencia de la AP en la dieta, con resultados muy distintos entre los peces carnívoros (con un alto requerimiento de proteína, 40 a 55% de la dieta) y peces herbívoros y omnívoros, (con un menor requerimiento de proteína, 25 a 35% de la dieta) (Halver and Hardy, 2002; Jobling, 2011; Bowyer, Qin and Stone, 2013; Heflin *et al.*, 2016). Actualmente, las dietas para peces herbívoros y omnívoros son casi desprovistas de AP, teniendo la harina de soja como la principal fuente de proteína (Tacon, Hasan and Metian, 2011; IFFO, 2013; Lehmkoetter, 2013). Sin embargo, uno de los principales problemas con el uso de fuentes alternativas de proteínas es su perfil distinto de aminoácidos cuando se compara con AP. Al igual que otros animales, los peces no tienen un requisito de proteína único, sino que requieren una mezcla bien equilibrada de aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales (Halver and Hardy, 2002; Li *et al.*, 2009; Jobling, 2011).

En la actualidad, los piensos vegetales (PV) y, en menor medida, las proteínas procesadas de animales (PPA) constituyen las principales fuentes de proteínas alternativas a la haría de pescado. En comparación con los PV, las PPA, como la harina de aves de corral, la harina de plumas y la harina de sangre, presentan un mayor valor nutricional para los peces debido a la ausencia de factores anti nutricionales, buena palatabilidad, alto contenido de proteínas (60 a 90%), y el contenido apropiado de aminoácidos esenciales, con la excepción de metionina (ARRAINA, 2016). A pesar de una tendencia creciente del uso de PPA en los piensos y sus precios competitivos, el PPA todavía representa menos del 1% del total de piensos utilizados en la producción mundial de alimentos acuáticos. La preocupación de los consumidores con respecto a su inclusión en los alimentos para peces se debe al riesgo de transmisión de enfermedades (Karapanagiotidis, 2014; Heflin *et al.*, 2016).

Los PV están altamente disponibles en el mercado global. PV presentan una composición nutricional relativamente constante, precios competitivos y pocos problemas de inocuidad, lo que los hace adecuados para su incorporación en alimentos acuáticos (Olsen and Hasan, 2012; Natale *et al.*, 2013; Coutinho *et al.*, 2015). En el lado negativo, los PV presentan un contenido de proteína muy variable; altos contenidos de carbohidratos, tanto digeribles (tales como almidón) como no digeribles (tales como fibras); insuficiencia de aminoácidos esenciales; una diversidad de factores anti-nutricionales (FAN) incluyendo fitato, que limita la disponibilidad de fósforo dietético (Jobling, 2011; Tacon, Hasan and Metian, 2011; Nogueira *et al.*, 2012; ARRAINA, 2016). Por otra parte, los PV son menos apetecibles que HP o PPA, con la que se debe tener cuidado adicional al formular dietas basadas en proteínas vegetales con el fin de no comprometer la ingesta del pienso (Kader *et al.*, 2012; ARRAINA, 2016).

Una manera posible de reducir la expresión de las enzimas clave de las vías metabólicas es a través de la modificación del genoma mediante la creación de animales transgénicos. Sin embargo, los animales y plantas transgénicos no son bien aceptados por los consumidores. Otra probabilidad de proveer una acuicultura sostenible se basa en modular la actividad o expresión de enzimas claves de estas vías mediante la programación nutricional, sin afectar el genoma. Varios estudios mostraron que las influencias dietéticas ejercidas en etapas del desarrollo temprano (ontogenia) pueden tener consecuencias a largo plazo.

1.3 METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS EN LOS PECES

En contraste con los vertebrados terrestres, los peces carnívoros parecen utilizar los carbohidratos de una manera menos efectiva. Por lo tanto, se acepta generalmente que estos peces no usan de forma primordial los carbohidratos dietéticos (Jobling, 2011). Se ha sugerido que, satisfacen sus requerimientos de glucógeno, en gran medida a través del catabolismo de aminoácidos (Halver and Hardy, 2002; Leaver, 2008).

La figura 3 muestra un modelo metabólico donde se evalúan las fuentes de aparición de glucosa en plasma a partir de la alimentación con carbohidratos y mediante gluconeogénesis a partir de los aminoácidos dietéticos (Rito *et al.*, 2017). Aunque diversos estudios han caracterizado diferentes enzimas del metabolismo de los carbohidratos, su papel y la contribución de los carbohidratos de la dieta a los requerimientos de energía total en peces no parecen aun totalmente clarificados, pues varios de ellos han indicado que la regulación hormonal y metabólica de los carbohidratos y del gasto energético varían según las especies de peces y difieren con respecto a mamíferos (Navarro *et al.*, 2002; Polakof *et al.*, 2012; Soengas, 2014).

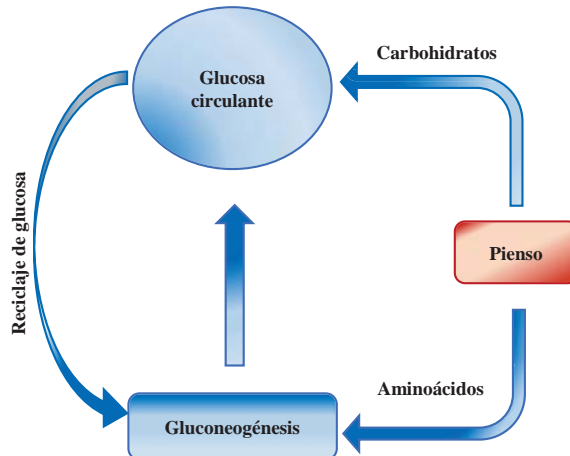


Figura 3. Modelo metabólico de las posibles fuentes de aparición de glucosa en plasma durante la alimentación con carbohidratos. La digestión de los carbohidratos en la dieta contribuye a la glucosa directamente a través de la absorción. La gluconeogénesis es alimentada por aminoácidos derivados de la dieta, así como por los equivalentes de piruvato de la glicólisis del tejido periférico de la glucosa circulante. Adaptado de Rito y colaboradores (2017).

1.3.1 Intolerancia a la glucosa en peces carnívoros

En los mamíferos, la glucosa es el combustible utilizado por la mayoría de los tejidos. Sin embargo, hasta qué punto los peces teleósteos pueden utilizar la glucosa y cuál es su contribución al metabolismo energético global aún no es bien comprendido. La glucosa ha sido descrita como el sustrato principal en varios tejidos. Sin embargo, las especies de peces carnívoros son tradicionalmente consideradas intolerantes a la glucosa (Wilson, 1994; Moon, 2001; Wang *et al.*, 2016). Esto se debe principalmente a la hiperglucemia persistente que se presenta después de la ingestión de una dieta rica en carbohidratos o de la administración glucosa (Polakof *et al.*, 2012; Soengas, 2014).

Este grado variable de intolerancia a la glucosa en teleósteos, parece explicarse, al menos en parte, por varios factores relacionados con el metabolismo de la glucosa y su control. Sin embargo, otras posibles causas de esta baja capacidad para metabolizar los carbohidratos siguen siendo menos exploradas, como el posible papel que ejercen los aminoácidos en la modulación transcripcional en la expresión de genes implicados en las diferentes vías metabólicas.

Inicialmente, se sugirió que niveles bajos de insulina endógena, observados en tests de tolerancia a glucosa, podrían contribuir al mantenimiento de una hiperglucemia prolongada y de la baja capacidad de los peces para utilizar niveles elevados de carbohidratos (Moon, 2001; Eames *et al.*, 2010; Polakof *et al.*, 2012). Sin embargo, los niveles de insulina en los peces son similares o a menudo más elevados que los observados en mamíferos (Plisetskaya, 1998; Navarro *et al.*, 2002; Gisbert, Sainz and Hung, 2003). No obstante, si bien se ha observado un aumento de la insulina en plasma después de la administración de glucosa en los peces, ciertos aminoácidos parecen ser estimuladores más potentes que la glucosa en la liberación de insulina (Enes *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Rito *et al.*, 2017).

Otros factores que explican la escasa utilización de la glucosa en los peces en comparación con los mamíferos son el número relativamente bajo de receptores de insulina y la menor capacidad de la glucosa para estimular la secreción de insulina en comparación con la de los aminoácidos (Navarro *et al.*, 2002). Además, la hiperglucemia persistente observada en peces carnívoros después de una ingesta de carbohidratos a pesar de la existencia de secreción de insulina y receptores de insulina en tejidos sensibles a

ésta, se asemeja al estado de resistencia a la insulina de seres humanos que padecen diabetes tipo 2 (Moon, 2001; Gisbert, Sainz and Hung, 2003; Enes *et al.*, 2011).

Otro factor estudiado con respecto a la baja capacidad de utilización de la glucosa en los peces es el transportador de glucosa (GLUT). La entrada de la glucosa circulante al interior de las células está condicionada por la presencia de transportadores específicos situados en las membranas. La ausencia de transportadores funcionales de glucosa (GLUTs) en el hígado, fue considerada otra posible causa de intolerancia a la glucosa en peces. Sin embargo, se describió la presencia de isoformas de peces homólogas a las de mamíferos, incluyendo GLUT1 de *Oncorhynchus mykiss* (Teerijoki *et al.*, 2000), *Cyprinus carpio* (Teerijoki *et al.*, 2001) y *Gadus morhua* (Hall *et al.*, 2004); GLUT2 de *Oncorhynchus mykiss* y *Gadus morhua* (Hall, Short and Driedzic, 2006); GLUT3 de *Ctenopharygodon idella* (Zhang *et al.*, 2003) y *Gadus morhua* (Hall *et al.*, 2005); y GLUT4 de *Oncorhynchus kisutch* (Capilla *et al.*, 2004) y *Gadus morhua* (Hall, Short and Driedzic, 2006).

1.3.2 Homeostasis de la glucosa en peces carnívoros

La homeostasis de la glucosa es el resultado de un equilibrio entre la utilización de glucosa (glucólisis) y la producción de glucosa (gluconeogénesis y glucogenólisis) (Figura 4). La gluconeogénesis y la glucólisis se coordinan de manera que dentro de una célula una vía es relativamente inactiva mientras que la otra es altamente activa. Los datos disponibles apoyan la hipótesis de que la capacidad relativamente baja de los peces, en particular las especies carnívoras, de utilizar eficientemente los carbohidratos dietéticos está parcialmente relacionada con una regulación inadecuada de la utilización de glucosa (glucólisis) y de la producción (gluconeogénesis) en el hígado.

En mamíferos, la ingesta de carbohidratos en la dieta induce significativamente la vía glicolítica y simultáneamente inhibe la gluconeogénesis (Iynedjian, 2009). Sin embargo, la inhibición posprandial de la producción endógena hepática de glucosa esta alterada y es una característica metabólica de la trucha arcoíris (S Panserat *et al.*, 2000; Panserat *et al.*, 2001; S. Panserat *et al.*, 2001). Esta falta de regulación de la gluconeogénesis también se observó en *S. aurata* (Caseras *et al.*, 2000).

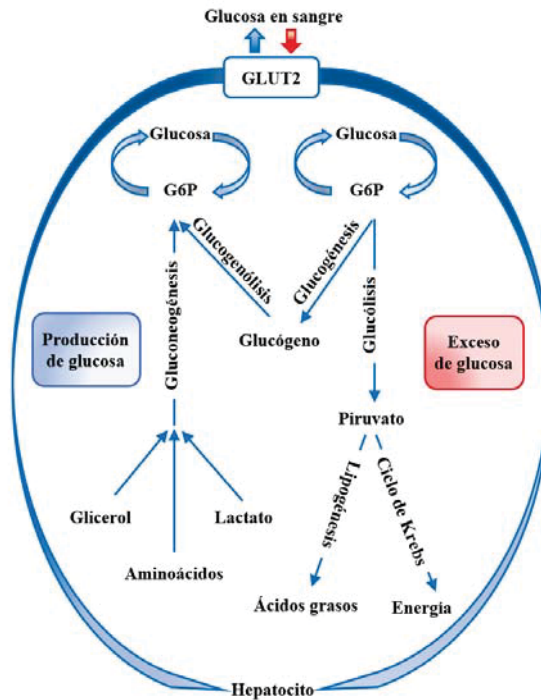


Figura 4. Principales vías metabólicas responsables de mantener la homeostasis de la glucosa.

Un punto limitante en el uso metabólico de la glucosa se encuentra en su fosforilación intracelular. El primer paso de “activación” de la glucosa es su fosforilación a glucosa-6-fosfato, lo cual permitirá su posterior uso energético o su almacenamiento. La reacción esta mediada por una enzima denominada hexoquinasa (cuando el sustrato es cualquier hexosa) y glucoquinasa (GK, cuando es específica de la glucosa). La incapacidad relativa de los peces carnívoros para utilizar la glucosa se describió que era debida en parte a la ausencia de actividad GK en hígado. Sin embargo, análisis bioquímicos indicaron la presencia de actividad tipo GK en el hígado de salmón atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), fletán (*Hippoglossu shipoglossus*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), besugo *Pagellus bogaraveo* y carpa común (*Cyprinus carpio*) (Polakof and Soengas, 2013; Panserat, Rideau and Polakof, 2014; Marandel *et al.*, 2017)

Por otra parte, se aisló y clonó el ADNc que codifica la GK de hígado de *S. aurata*, y se estudió la modulación de la expresión génica en función del estado nutricional de los peces (Caseras *et al.*, 2000). Estos resultados respaldan la hipótesis de que la GK es funcional en el hígado de los peces, aunque la baja capacidad de los peces para metabolizar la glucosa puede ser el resultado, al menos en parte, de que la GK sea menos eficiente que la de otras especies. Una menor actividad GK en hígado de peces, podría ser responsable de la baja utilización de los carbohidratos y las características “*diabetes-like*” de estos animales (Wilson, 1994; Polakof *et al.*, 2012; Panserat, Rideau and Polakof, 2014).

Adicionalmente a la inducción de la expresión de GK, la alimentación con dietas ricas en carbohidratos induce la expresión del gen fosfofructoquinasa-2/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB1) en el hígado de especies como trucha arcoíris y dorada (Metón *et al.*, 2000; Panserat, Plagnes-Juan and Kaushik, 2001), en asociación con altos niveles de expresión génica de piruvato quinasa (PK) (Panserat, Rideau and Polakof, 2014). Por lo tanto, una regulación ineficaz de la vía glicolítica no parece explicar la baja capacidad de utilización de carbohidratos en la dieta por los peces.

La gluconeogénesis y la glicogenolisis son las vías metabólicas implicadas en la producción de glucosa endógena por el hígado. En ratas, la expresión génica de las enzimas clave de la vía gluconeogénica como; fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) y glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) se inducen por ayuno y se reprimen al alimentar una dieta rica en carbohidratos. En contraste con lo observado en mamíferos, PEPCK y FBPasa-1 se expresan independientemente del estado nutricional en los peces (S Panserat *et al.*, 2000; Panserat *et al.*, 2001). En la trucha arcoíris, la dorada, la lubina europea y el salmón del Atlántico, no se observaron modificaciones en la expresión y/o las actividades de los genes PEPCK, FBPasa-1 y G6Pasa debido a los carbohidratos dietéticos (S Panserat *et al.*, 2000; S. Panserat *et al.*, 2000, 2001; Enes *et al.*, 2006). Esto sugiere que hay un alto nivel persistente de producción de glucosa endógena en el hígado de pescado debido a una falta de regulación de la gluconeogénesis por los carbohidratos de la dieta (Enes *et al.*, 2009; Polakof *et al.*, 2012; Marandel *et al.*, 2017).

1.4 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN PECES

La maquinaria metabólica en los peces es similar a la de los mamíferos, a pesar de que los carbohidratos y los lípidos son las fuentes de energía preferidas en los mamíferos, mientras que las proteínas y los lípidos son las principales fuentes de energía en la mayoría de las especies de peces (Enes *et al.*, 2009). Las principales diferencias entre el metabolismo intermediario de mamíferos y peces están relacionadas con el control hormonal de la utilización de nutrientes y los productos finales de la excreción de nitrógeno. Contrariamente a los mamíferos, la mayoría de los peces no tienen un ciclo funcional de urea y excretan directamente los residuos nitrogenados en el agua en forma de amoníaco (NH_4^+), un proceso que requiere poco gasto energético (Walton and Cowey, 1982; Halver and Hardy, 2002; Dolomatov *et al.*, 2011).

El hígado es el órgano más importante que gobierna la homeostasis de los aminoácidos. De hecho, es el principal órgano responsable de la síntesis de aminoácidos no esenciales, tiene la más alta tasa de síntesis proteica y una alta tasa de reciclaje de proteínas, lo que justifica las altas actividades de enzimas catabólicas (Walton and Cowey, 1982; Kaushik and Seiliez, 2010). A pesar de muchos años de investigación sobre el metabolismo de los aminoácidos en peces, se sabe relativamente poco acerca de los factores que regulan el flujo de los aminoácidos en las vías catabólicas y anabólicas. Se ha sugerido que algunos aminoácidos se dirigen preferentemente hacia el crecimiento en lugar de hacia el catabolismo en peces. Este hecho podría deberse a que la K_m de las aminoacil-tRNA sintetasas sea unas 10 veces más baja que la K_m de las transaminasas, enzimas que conducen a los aminoácidos a vías oxidativas (Walton and Cowey, 1982; Halver and Hardy, 2002). Por otra parte, la cantidad de aminoácidos libres juega un papel importante en la regulación de la síntesis de proteínas (Houlihan, Mathers and Foster, 1993) y la proporción de aminoácidos lo hace a su vez sobre el crecimiento y desarrollo (Li *et al.*, 2009).

En peces, los aminoácidos son insulinoatrópicos más importante que la glucosa y, este efecto de los aminoácidos difiere en función de la especie de pez estudiada. En el lenguado, la arginina es el principal aminoácido insulinoatrópico, seguido de la alanina, metionina y serina (Andoh, 2007). La arginina es también un potente agente insulinoatrópico en otras especies de peces, como son la anguila europea (Ince and Thorpe,

1977), pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Ronner and Scarpa, 1987) y salmón plateado (Plisetskaya *et al.*, 1991).

La actividad insulínica es específica de los aminoácidos, indicando que los sensores relacionados con la secreción de insulina pueden reconocer la estructura terciaria de los aminoácidos. En estudios realizados en anguila europea (Murai and Ogata, 1990) se ha descrito que las concentraciones de los aminoácidos libres en plasma disminuyen significativamente después de la inyección intramuscular de insulina. Esto explica que la insulina puede causar una disminución tanto de los niveles de aminoácidos como de glucosa en sangre.

1.4.1 Catabolismo de los aminoácidos en peces

Después del consumo de alimento, los aminoácidos absorbidos alcanzan el hígado a través del sistema portal hepático y, dependiendo del estado nutricional de los peces y la calidad de la proteína alimentaria, el aminoácido se utiliza para la síntesis de proteínas, para la producción de energía a través del ciclo del ácido cítrico, glucosa (gluconeogénesis) o ácidos grasos (a través de la lipogénesis) (Wilson, 1994; Halver and Hardy, 2002; Ohkubo and Matsubara, 2002; Polakof *et al.*, 2012; Betancor *et al.*, 2014).

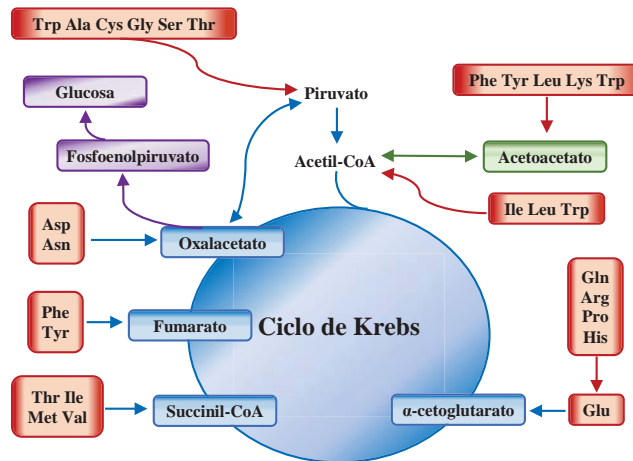
El primer paso en el catabolismo de los aminoácidos consiste en eliminar el grupo amino del aminoácido. Para algunos aminoácidos esto puede ocurrir a través de la desaminación directa por enzimas específicas, con formación de amoníaco. Sin embargo, la mayoría de aminoácidos siguen una vía de transaminación, en la que las transaminasas (o aminotransferasas) catalizan la transferencia reversible de un grupo amino de un aminoácido a un α -cetoácido, generando un nuevo aminoácido. Después de la eliminación del grupo amino, la cadena de carbono (α -cetoácido) entra en el ciclo de ácido cítrico en diferentes puntos (figura 5A) para generar energía o convertirse en productos de almacenamiento de energía, tales como glicógeno y lípidos, a través de las vías gluconeogénica y lipogénicas, respectivamente (Walton and Cowey, 1982; Hillart and Van Raaij, 1995; Jürss, Bastrop and Jürss, 1995; Halver and Hardy, 2002; Bibiano Melo *et al.*, 2006; McMahan *et al.*, 2010). Por lo tanto, la vía de transaminación es con frecuencia el primer paso en la degradación de aminoácidos y el último paso en la biosíntesis de aminoácidos no esenciales (Figura 5A y B).

En los teleósteos, como *S. aurata*, más del 70% del amoníaco se produce a partir del catabolismo de aminoácidos en el hígado, principalmente por transaminación (Jürss, Bastrop and Jurss, 1995; Stanley, 2009; Cowey and Knox, 2017). En esta vía, un aminoácido es transaminado y eventualmente origina glutamato (Glu), que luego es desaminado oxidativamente por la glutamato deshidrogenasa (GDH), para formar α -cetoglutarato y amoníaco. La alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) son responsables de las etapas de transaminación, convirtiendo alanina (Ala) y aspartato (Asp) en Glu, respectivamente, siendo consideradas, junto con GDH, las enzimas más relevantes en el catabolismo de aminoácidos (Figura 5B) (Engelking, 2015).

ALT y AST están presentes en citosol y mitocondrias, y GDH se encuentra en la matriz mitocondrial, por lo que la transaminación es un proceso que mayoritariamente se realiza en la mitocondria. Además, GDH es una enzima alostérica, inhibida por ATP y GTP, y activada por ADP, constituyendo una enzima clave de control para el catabolismo de aminoácidos (Walton and Cowey, 1982; Jürss, Bastrop and Jurss, 1995; Engelking, 2015).

Las actividades de las enzimas catabolizantes de aminoácidos hepáticos se han utilizado como indicadores de la utilización metabólica de aminoácidos, en los casos de sustitución dietética de aminoácidos o el desequilibrio dietético de aminoácidos, donde se ven afectadas las actividades específicas de ALT, AST y GDH (Moyano, Cardenete and De la Higuera, 1991; Gomez-Requeni *et al.*, 2003; Peres and Oliva-Teles, 2005, 2006a, 2007; Du *et al.*, 2011; Bañuelos-Vargas *et al.*, 2014). Sin embargo, en los peces, los efectos del perfil dietético de aminoácidos en estas actividades enzimáticas son relativamente contradictorios, con varios estudios que indican una ausencia de regulación de algunas de estas enzimas a pesar de los cambios en los perfiles dietéticos de aminoácidos (Moyano, Cardenete and De la Higuera, 1991; Gomez-Requeni *et al.*, 2003; Peres and Oliva-Teles, 2005, 2006b, 2007; Rolland *et al.*, 2016). De hecho, Cowey (1995) consideró que las enzimas catabolizantes hepáticas de los peces no eran adaptativas, mientras que Moyano y colaboradores (1991) reportaron que las actividades de las enzimas GDH y transaminasas eran altamente susceptibles a diferentes factores nutricionales.

A.



B.

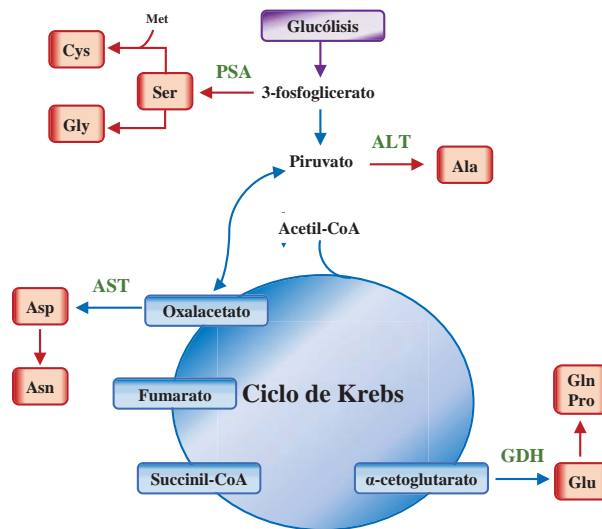


Figura 5. Interconversión de intermediarios del ciclo del ácido cítrico y aminoácidos.

A. Intermediarios del ciclo del ácido cítrico siguiendo el catabolismo de aminoácidos. B. Biosíntesis de aminoácidos esenciales por intermediarios del ciclo de ácido cítrico. Alanina (Ala); Triptófano (Trp); Cisteína (Cys); Glicina (Gly); Treonina (Thr); Serina (Ser); Leucina (Leu); Tirosina (Tyr); Fenilalanina (Phe); Lisina (Lys); Isoleucina (Ile); Histidina (His); Prolina (Pro); Glutamina (Gln); Arginina (Arg); Glutamato (Glu); Valina (Val); Asparagina (Asn) Aspartato (Asp); Metionina (Met); Fosfoserina aminotransferasa (PSA); Alanina aminotransferasa (ALT); Aspartato aminotransferasa (AST); Glutamato deshidrogenasa (GDH). Adaptado de Engelking, (2015).

1.4.2 Gluconeogénesis a partir de aminoácidos en peces

A pesar de la pobre utilización de los carbohidratos, los peces requieren glucosa ya que esta representa el combustible preferido para el cerebro y el tejido nervioso, los glóbulos rojos y las gónadas (Walton and Cowey, 1982). Una gran parte de la gluconeogénesis es proporcionada por el catabolismo de aminoácidos. Por lo tanto, en los peces, especialmente en los peces carnívoros, la gluconeogénesis adquiere especial importancia.

Los principales precursores gluconeogénicos son lactato, piruvato, glicerol y los aminoácidos gluconeogénicos (Nordlie, Foster and Lange, 1999; Barthel and Schmolli, 2003). El catabolismo de aminoácidos gluconeogénicos contribuye a la generación de energía metabólica y proporciona sustratos para la gluconeogénesis hepática para mantener la concentración de glucosa en la sangre (Ruderman, 1975) (Figura 5). Entre los aminoácidos gluconeogénicos, es la serina, el principal sustrato gluconeogénico en peces. No obstante, *in vivo*, se piensa que la alanina es cuantitativamente el aminoácido más importante (Mommensen, French and Hochachka, 1980; Andoh, 2007). Como en el caso de los mamíferos es posible que, la gluconeogénesis a partir de alanina sea cuantitativamente la vía más importante en peces (Jürss, Bastrop and Jürss, 1995; Andoh, 2007; Li *et al.*, 2009). La tasa de síntesis de glucosa a partir de aminoácidos en hepatocitos hallados en trucha sigue el orden: serina > aspargina > alanina > glicina > prolina > valina (Walton and Cowey, 1982)

Los aminoácidos no sólo son precursores de glucosa y ácidos grasos, suministrando esqueletos de carbono para la gluconeogénesis y la lipogénesis, sino que también son moléculas de señalización (Walton and Cowey, 1982; Berg, Tymoczko and Stryer, 2002). Estudios en trucha demostraron que la elevación de la expresión de los genes catabólicos de aminoácidos hepáticos se asoció con una mayor activación de mTOR tanto *in vivo* como *in vitro* (Lansard *et al.*, 2011; Seiliez *et al.*, 2011), implicando que la expresión de genes catabólicos de aminoácidos hepáticos está controlada por mTORC1. Además, una dieta rica en proteínas y baja en carbohidratos no sólo induce una mayor activación de mTOR sino que también regula positivamente la expresión de serina deshidratasa (SD) y el complejo cadena alfa ramificada-cetoácido deshidrogenasa (BCKD) en el hígado y la expresión de BCKD-E2 en el músculo (Seiliez *et al.*, 2011). Por lo tanto, no es

sorprendente que la insulina también regule la expresión de genes catabólicos de aminoácidos (SD, ASAT1, BCKDE2, GDH) a través de la activación mTORC1 (Dai *et al.*, 2015).

1.4.3 Importancia del glutamato en el metabolismo de proteínas

El glutamato está en el centro de la eliminación de la carga proteica por tres razones. Primero, está la "familia glutamato" de aminoácidos. Estos aminoácidos (glutamato, glutamina, prolina, histidina, arginina y ornitina) comprenden el 25% de la ingesta de aminoácidos en la dieta y se metabolizan mediante la conversión a glutamato. En segundo lugar, está el papel clave de la GDH junto con las aminotransferasas ligadas al glutamato en la realización de la eliminación del nitrógeno del α -amino de casi todos los aminoácidos vía transaminación. En tercer lugar, en mamíferos, está el papel clave del glutamato en la síntesis de N-acetilglutamato, que asegura que la tasa de síntesis de urea está de acuerdo con las tasas de desaminación de aminoácidos. Sin embargo, los peces teleósteos, son amoniotélicos, es decir que el amoníaco producido por el catabolismo de los aminoácidos entra en el sistema circulatorio y es excretado por las branquias por difusión pasiva como amonio (NH_4^+) al medio acuático (Wilkie, 2002; Randall and Ip, 2006; Wright and Wood, 2009).

1.4.4 Papel de la GDH en la transaminación, desaminación y excreción de amonio

La degradación de los aminoácidos se puede dividir en 3 etapas: Transaminación, desaminación oxidativa y síntesis de urea (en organismos ureatélicos) o excreción de amonio (en animales amoniotélicos) (Ohkubo and Matsubara 2002; Randall and Ip 2006; Wright and Wood 2009). Todos los aminoácidos comunes, excepto la lisina, pueden ser transaminados y, el papel crucial del glutamato/ α -cetoglutarato como intermediarios de transaminación está bien reportado. Del mismo modo, la importancia de la GDH, en conjunción con las aminotransferasas, en la transaminación de aminoácidos está bien establecida (Moyano, Cardenete and De la Higuera, 1991; Jürss, Bastrop and Jürss, 1995; Halver and Hardy, 2002; Andoh, 2007; Engel, 2014).

Cuando hay un exceso proteico en la dieta, el excedente de aminoácidos ingeridos que no se utilizan para sintetizar proteínas no pueden almacenarse y, por lo tanto, deben ser catabolizados. Los aminoácidos se pueden transaminar a glutamato, que es desaminado por la GDH para producir α -cetoglutarato, que puede utilizarse como molécula precursora en la gluconeogénesis y producir glucosa y piruvato a partir de una fuente sin hidratos de carbono. Eventualmente el α -cetoglutarato puede convertirse a acetil-CoA para ser incorporado en ácidos grasos (Ruderman, 1975; Jürss, Bastrop and Jürss, 1995; Berg, Tymoczko and Stryer, 2002; Bibiano Melo *et al.*, 2006; Andoh, 2007; Spanaki and Plaitakis, 2012; Engel, 2014)

Dado que la glutaminasa y la GDH son enzimas mitocondriales, el amonio es producido en la matriz mitocondrial. El principal tejido formador de amonio en los peces, es el hígado. En algunas especies de peces, particularmente bajo condiciones medioambientales adversas, cuando la excreción de amonio es deficiente, se desencadena la excreción de urea (Wood, Pärt and Wright, 1995; Saha and Ratha, 1998; Polez, Moraes and Santos Neto, 2003; Moraes and Polez, 2004).

Otras enzimas capaces de producir amonio mediante la desaminación son: histidinasa, serina desaminasa, glutaminasa y la asparaginasa, pero no son consideradas como contribuidores principales de amonio (French, Mommsen and Hochchka, 1981; Walton and Cowey, 1982; Dolomatov *et al.*, 2011; Lansard *et al.*, 2011). La vía principal de desaminación es la propuesta por Braunstein y Bychkov, que es la que realiza la GDH (Fisher and Mcgregor, 1961).

1.5 GLUTAMATO DESHIDROGENASA

GDH está presente en casi todos los organismos vivos (Hudson and Daniel, 1993). En los animales la GDH representa hasta el 10% de la proteína en la matriz mitocondrial (Rothe, Brosz and Storm-Mathisen, 1995), pero su función exacta a nivel celular aún no se entiende completamente.

GDH cataliza la desaminación oxidativa del glutamato, una reacción dependiente de NAD(P)^+ , liberando α -cetoglutarato, NH_3 y NAD^+ . La enzima también cataliza la reacción inversa, la aminación reductora de α -cetoglutarato a glutamato usando NAD(P)H como cofactor (Figura 6). En animales, tanto NAD^+ como NADP^+ pueden ser aceptores de electrones (Li, Li, Allen, Charles A. Stanley, *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2015; Bunik *et al.*, 2016; Plaitakis *et al.*, 2017a).

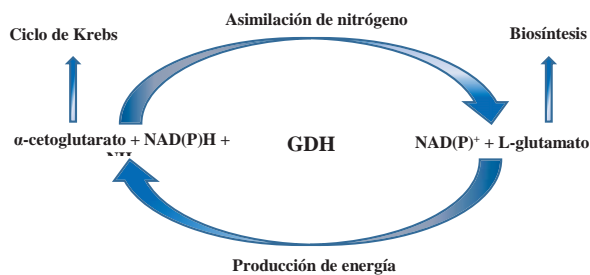


Figura 6. Presentación esquemática de las reacciones catalizadas por GDH y su significación metabólica general. Adaptado de Bunik y colaboradores (2016).

Dado que GDH participa en varias vías metabólicas importantes, se considera que es esencial un control estricto de su actividad. Datos obtenidos *in vitro* usando GDH purificada, han demostrado que la enzima está sujeta a una compleja regulación alostérica. Aunque los mecanismos moleculares implicados en esta regulación siguen siendo poco conocidos (Smith and Stanley, 2008), diversos compuestos químicos, tales como nucleótidos de purina (ADP, ATP, GTP), NADH (Sener and Malaisse, 1980; Bailey, Bell and Bell, 1982), palmitoil-CoA (Fahien and Kmietek, 1981), hormonas esteroides (Yielding and Tomkins, 1960; Tomkins, Yielding and Curran, 1962) y neurolepticos (Fahien and Shemisa, 1970; Couée and Tipton, 1990) influyen la actividad GDH. Esta regulación multifacética parece haber evolucionado en paralelo a la complejidad de los organismos (Li, Li, Allen, Charles A Stanley, *et al.*, 2012).

1.5.1 Localización intracelular de GDH

Inicialmente se proponía que la GDH en eucariotas estaba localizada exclusivamente en las mitocondrias. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado la presencia de la actividad GDH en la fracción nuclear (Prisco, Banay-Schwartz and Strecker, 1968; di Prisco and Casola, 1975; Colon *et al.*, 1986; Lai *et al.*, 1986; Msdaniel, 1995). Las enzimas nucleares y mitocondriales exhiben diferentes propiedades de solubilización durante la purificación y propiedades cinéticas características. En particular, la enzima mitocondrial se solubiliza en sacarosa 0,25 M mientras que la solubilización de la isoforma nuclear requiere la adición de fosfato potásico 0,1 M (Prisco, Banay-Schwartz and Strecker, 1968). Un estudio en hígado de pollo GDH (Purohit *et al.*, 2013) confirmó la localización nuclear de esta enzima (Prisco, Banay-Schwartz and Strecker, 1968; di Prisco and Casola, 1975; Colon *et al.*, 1986; Msdaniel, 1995), descubriendo la capacidad de GDH para actuar como una serina proteasa de la histona H3 (Purohit *et al.*, 2013). GDH también se encontró en el retículo endoplasmático granular de hígado de rata (Lee *et al.*, 1999). Otra forma de GDH, que se localizó en lisosomas y endosomas, tiene una actividad de unión a la tubulina en presencia de ATP *in vitro* (Rajas, Gire and Rousset, 1996). La colocalización de GDH con elementos citoesqueléticos (es decir, la proteína GFAP de los filamentos intermedios) se ha confirmado en astrocitos humanos (Spanaki *et al.*, 2014).

1.5.2 Múltiples formas de GDH

Las múltiples formas de GDH representan isoenzimas e isoformas diferentes: las isoenzimas son los productos de diferentes genes, mientras que las isoformas son codificadas por un solo gen y surgen a través del empalme alternativo del ARNm o asociados a procesos pre y post traduccionales. El empalme alternativo incrementa el número de isoformas de GDH transcritas del mismo gen. En humanos, 4 precursores de ARN (Mavrothalassitis *et al.*, 1988) derivan a 4 formas de GDH, que varían en masa molecular y punto isoeléctrico (Hussain, Zanniss and Plaitakis, 1969). Para el gen *GLUD1* humano se conocen 3 transcritos, y cada uno codifica una isoforma de la isoenzima GDH1, mientras que para el gen *GLUD2* se conoce un único transcrito que codifica la isoenzima GDH2.

La mayoría de las especies de mamíferos poseen una sola enzima (GDH1). Sin embargo, los seres humanos y otros primates han adquirido vía duplicación una segunda isoenzima específica de GDH (GDH2) con una regulación y un perfil de expresión tisular distinta (Shashidharan *et al.*, 2002; Burki and Kaessmann, 2004; Plaitakis, Latsoudis and Spanaki, 2011a). La isoenzima GDH1, codificada por el gen *glud1*, en el cromosoma 10 humano, se expresa en todos los tejidos. Un segundo gen (*glud2*) codifica la isoenzima GDH2, sin intrones y situada en el cromosoma X en humanos. Este gen se expresa en el tejido neural, riñones y órganos esteroideogénicos como los testículos (Shashidharan *et al.*, 1994; Spanaki *et al.*, 2014; Plaitakis *et al.*, 2017b). La proporción de las dos isoenzimas difiere en cada tejido. Por ejemplo, en el hígado sólo está presente GDH1, mientras que en células de Sertoli y neuronas corticales solamente está presente GDH2. Los astrocitos contienen cantidades comparables de ambas isoenzimas (Spanaki, Kotzamani and Plaitakis, 2017).

1.5.3 Estudios estructurales del GDH

La GDH mitocondrial en animales existe como un homohexámero, teniendo cada subunidad una masa molecular de aproximadamente 56 kDa. Cada monómero se compone de tres dominios principales: el dominio N-terminal de unión a glutamato (Glu-BD), el dominio de unión del NAD⁺ o NADP⁺ (NAD-BD) y los dominios reguladores, que son 48 residuos parecidos a una antena que se extienden desde la parte superior del dominio NAD-BD (Figura 7) (Smith and Stanley, 2008; Li *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2015; Bunik *et al.*, 2016; Plaitakis *et al.*, 2017b).

El NAD-BD y el Glu-BD forman el centro catalítico. La unión del sustrato produce cambios conformacionales en el NAD-BD. Este cambio produce una rotación alrededor de la hélice del NAD-BD, llamada hélice pivote y enrollamiento de la hélice de la antena. La posición relativa de los monómeros es tal que la rotación sobre la hélice pivote de cada monómero no está restringida. Las antenas de las tres subunidades de los trímeros sufren cambios conformacionales cada vez que el centro catalítico se abre y se cierra. La antena sirve como medio de comunicación entre las subunidades durante la cooperación negativa y la regulación alostérica (Peterson and Smith, 1999; Bunik *et al.*, 2016; Plaitakis *et al.*, 2017a). Sin embargo, la ausencia de "antenas" en GDH de otras especies, tales como GDH de *Neurospora sp.* o GDH de *Clostridia sp.* (Allen *et al.*, 2004), no equivale a una falta de regulación alostérica. De hecho, las GDH de otros organismos pueden ser

reguladas alostéricamente por otros elementos de su estructura (Syed, Engel and Parker, 1991; Wang and Engel, 1995; Hamza and Engel, 2008).

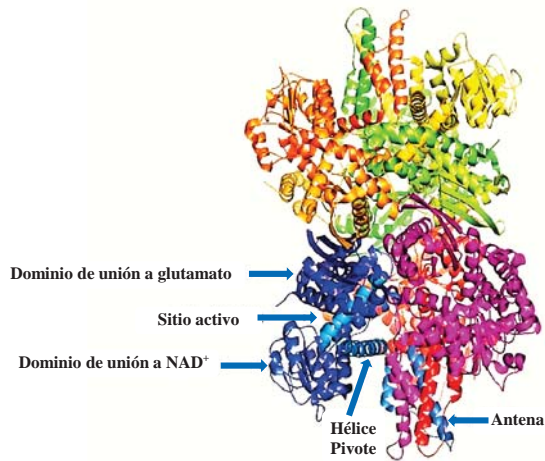


Figura 7. Modelo estructural de GDH1. Se muestra un diagrama del hexámero GDH1, donde cada una de las seis subunidades se colorea de manera diferente. Las partes principales de la subunidad GDH (sitio activo, dominio de unión NAD^+ , dominio de unión al glutamato, antena y hélice pivote) se indican sólo para la subunidad azul. Imagen adaptada de Plaitakis y colaboradores (2017a).

La GDH1 tiene dos sitios de unión para coenzimas: uno en el NAD-BD que es capaz de unirse con el NAD^+ o NADP^+ y participa directamente en el proceso catalítico; y el segundo, que tiene una función reguladora y está situado justo debajo de la hélice pivote, puede unirse a ADP, NAD^+ o NADH, pero no puede unirse correctamente a NADPH. Una importante adaptación funcional de la GDH2, es la resistencia a la inhibición de GTP a través de la sustitución evolutiva de Gly456 por Ala (Zaganas and Plaitakis, 2002). Estas propiedades funcionales pueden proporcionar una ventaja biológica al ser humano permitiendo que GDH2 funcione independientemente de la función del ciclo de Krebs. Sin embargo, para evitar que la catálisis enzimática no regulada perturbe el metabolismo celular, GDH2 desarrolló un mecanismo molecular alternativo, según el cual la nueva enzima regula su actividad basal (aproximadamente 4% -6% de su capacidad), manteniendo una notable activación por el aumento de ADP y/o niveles de L-leucina (Plaitakis, Metaxari and Shashidharan, 2000; Kanavouras *et al.*, 2007).

1.5.4 Características cinéticas de la GDH

Se sabe que el equilibrio termodinámico de la GDH de mamíferos favorece la síntesis de glutamato, pero no está claro si la enzima *in vivo* opera hacia la dirección reductora de aminación o hacia la dirección de oxidación desaminación.

Debido a que la reacción catalizada por GDH es reversible, se espera que su dirección dependa de la concentración de los sustratos y de la afinidad de la enzima para estos sustratos. Además de las concentraciones de sustrato, la catálisis de GDH se ve afectada por el pH, la fuerza iónica y la composición del tampón (Bailey, Bell and Bell, 1982; Kanavouras *et al.*, 2007; Engel, 2014). Por lo tanto, los estudios sobre GDH, purificada a partir de tejidos de mamíferos o con GDH1 humana recombinante, han demostrado que la enzima funciona óptimamente a un pH relativamente básico (7,75 a 8,0) (Kanavouras *et al.*, 2007) y que la activación por ADP disminuye notablemente a valores de pH más bajos. Por otro lado, el pH óptimo para GDH2 humana es de 7,5, siendo la enzima capaz de operar eficientemente a valores de pH aún más bajos (7,25 a 7,0) (Kanavouras *et al.*, 2007).

La K_m relativamente alta para el amoníaco sugiere que GDH actúa preferentemente en la dirección de la desaminación oxidativa, particularmente en tejidos con concentraciones normalmente bajas de amoníaco, ya que la concentración necesaria para impulsar la reacción para favorecer la formación de glutamato podría ser toxica para un animal; debido a esta restricción biológica, la reacción de formación de glutamato nunca llega a un grado significativo en los animales (Li *et al.*, 2014; Bunik *et al.*, 2016; Plaitakis *et al.*, 2017a). Sin embargo, vale la pena señalar que algunas plantas, algas y bacterias usan la reacción de aminación para formar glutamato a partir de amoníaco y α -cetoglutarato debido a su tolerancia al amoníaco (Lightfoot, Green and Cullimore, 1988).

Hay pruebas de que la K_m del amoníaco se ve afectada por el pH celular. De este modo, usando GDH1 humana recombinante, Zaganas y colaboradores (2013) demostraron que la reducción del pH del tampón de 8,0 a 7,5 o hasta 7,0 aumenta la K_m para el amoníaco de 12,8 mM a 35,0 mM y 57,5mM respectivamente. Estos resultados sugieren una acidificación intracelular, y esto puede ocurrir en los astrocitos tras de la captación de glutamato (Azarias *et al.*, 2011) o en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales del riñón durante acidosis sistémica, donde esencialmente se impide la aminación de α -cetoglutarato (van de Poll *et al.*, 2004).

1.5.5 Regulación de la GDH

Como se ha descrito anteriormente, la GDH de mamífero está regulada alostéricamente, con compuestos químicamente diversos que influyen en la velocidad de la enzima. Estos compuestos incluyen nucleótidos de purina (ADP, ATP y GTP) (Bailey, Bell and Bell, 1982; Banerjee *et al.*, 2003), NADH, L-leucina, palmitil-CoA, espermidina (Sener and Malaisse, 1980; Fahien and Kmietek, 1981; Jarzyna, Lietz and Bryla, 1994; Spanaki *et al.*, 2012), hormonas esteroideas y fármacos neurolépticos (Tomkins, Yielding and Curran, 1962; Li *et al.*, 2006; Plaitakis, Latsoudis and Spanaki, 2011b).

GTP y ADP actúan como los principales moduladores endógenos negativos y positivos para GDH1, respectivamente. Esta interacción alostérica actúa como un mecanismo de detección de energía por el cual la actividad enzimática es controlada por las necesidades de ATP celular (Mastorodemos *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2015; Bunik *et al.*, 2016). Parece que en algunos tejidos, como las células pancreáticas, GDH1 está bajo inhibición por GTP (generado por el ciclo de Krebs), con ADP y L-leucina contrarrestando la inhibición de GTP de una manera dependiente de la concentración. Aunque GTP inhibe potentemente GDH1, tiene poco efecto sobre GDH2 (Plaitakis, Metaxari and Shashidharan, 2000). Por otro lado, el ADP induce una mayor activación proporcional de GDH2 que GDH1. Sin embargo, el ADP muestra una afinidad algo mayor para GDH1 que para GDH2. L-Leucina (0,5-5 mM) también induce una mayor activación proporcional de GDH2 que de GDH1, pero con una afinidad similar para ambas enzimas (Kanavouras *et al.*, 2007). Se cree que estas diferencias respecto a ADP y la activación de L-leucina reflejan el hecho de que la evolución de GDH2 afectó predominantemente a residuos en el dominio regulador (donde se une ADP). Este concepto es consistente con las observaciones que muestran que, aunque GDH1 y GDH2 difieren marcadamente en la regulación, muestran similares propiedades catalíticas.

1.5.6 Modificaciones post-traduccionales de GDH

1.5.6.1 ADP-ribosilación dependiente de NAD⁺

Se ha demostrado recientemente que la sirtuína 4 (SIRT4), una ADP-ribosiltransferasa mitocondrial humana, inhibe la actividad de GDH usando NAD⁺ para

ADP-ribosilar la enzima (Herrero-Yraola *et al.*, 2001). SIRT4 transfiere la ADP-ribosa de NAD⁺ a un residuo de cisteína de GDH. Se ha demostrado una modificación tanto *in vitro* como *in vivo* en la actividad GDH (Karaca *et al.*, 2015). En ratones *Knock-out* para SIRT4 se observa una activación de GDH. Así mismo, también, una alimentación baja en calorías reduce la actividad de SIRT4, lo que promueve la activación de GDH en células pancreáticas (Haigis *et al.*, 2006). Así mismo, el GDH ADP-ribosilado aislado puede ser reactivado por la ADP-ribosilcisteína hidrolasa mitocondrial (Karaca *et al.*, 2015).

1.5.6.2 Fosforilación

Estudios recientes proteómicos han permitido identificar múltiples sitios de fosforilación de serina, treonina y tirosina en GDH de mamíferos (Villen *et al.*, 2007; Ballif *et al.*, 2008; Bian *et al.*, 2014). Sin embargo, la significación funcional de las reacciones específicas de fosforilación de GDH permanece desconocida. En algunas especies de caracoles como en *Otala lactea*, la forma fosforilada de la GDH posee una actividad 3 veces superior en la reacción de desaminación de glutamato. Debido a este cambio metabólico, los iones de amonio y, posteriormente, la urea se acumula en los tejidos de los caracoles latentes. Además, la forma fosforilada de GDH tiene una sensibilidad reducida a la activación por ADP, como resultado, a los bajos requerimientos energéticos del estado latente (Bell, Dawson and Storey, 2012).

La fosforilación de GDH en cangrejos de río en condiciones hipóxicas conduce a la estimulación de la aminación reductora de α -cetoglutarato, reduciendo la actividad del ciclo de ácido tricarbóxico y la producción de ATP (Dawson and Storey, 2012). La fosforilación de GDH también se ha descrito en mamíferos (geómidos). En contraste con el caracol, la fosforilación de GDH en geómidos disminuye durante la hibernación, con la forma desfosforilada de GDH desplazando el metabolismo hacia la formación de α -cetoglutarato y estimulando la gluconeogénesis en hígado (Bell and Storey, 2010).

1.5.6.3 Acilación de lisina y cisteína

Se ha demostrado que la GDH pierde el 80% de su actividad catalítica después de la acetilación *in vitro* de un grupo amino de la subunidad, y la acetilación debilita significativamente la interacción entre las subunidades enzimáticas (Colmans and Frieden, 1966). La disociación resultante del hexámero causa una regulación alostérica

alterada: la afinidad de la enzima acetilada con los iones de cinc y GTP (ambos inhibidores de la GDH) disminuye, mientras que la de ADP (activador) aumenta.

Se encontró que al menos 11 residuos de lisina del monómero GDH estaban acetilados *in vivo* (Lombard *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010). La acetilación de Lys477 y Lys480, que se encuentran en el dominio de las antenas, también puede afectar a las interacciones entre las subunidades y el comportamiento alostérico de GDH (Baeza, Smallegan and Denu, 2015, 2016). El nivel de acetilación de GDH está regulado por una acetiltransferasa mitocondrial aún no identificada y una desacetilasa mitocondrial dependiente de NAD^+ , sirtuína 3 (SIRT3) (Figura 8). La incubación de GDH con SIRT3 recombinante en presencia de NAD^+ resulta en la desacetilación de la enzima (Schlicker *et al.*, 2008). Además, en ratas *knock-out* para SIRT3 se observó una GDH hiperacetilada (Lombard *et al.*, 2007). Así, múltiples líneas evidencia que SIRT3 controla el nivel de acetilación GDH *in vivo*.

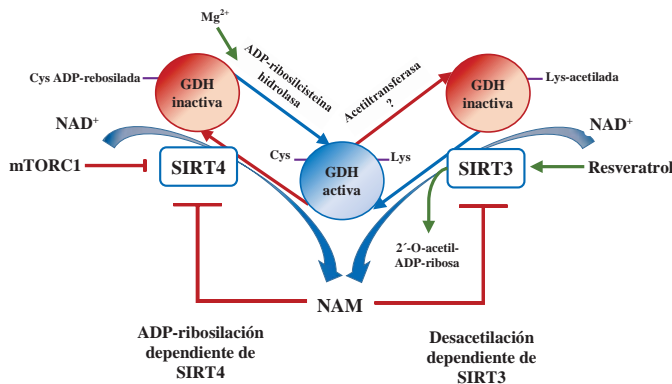


Figura 8. Representación esquemática de modificaciones post-traduccionales de GDH reguladas por sirtuína 3 y sirtuína 4. Imagen adaptada de Lombard y colaboradores (2007).

Además de la acetilación, la GDH puede estar implicada en otras reacciones de acilación, tales como succinilación, malonilación y acilación por ácidos grasos. Muchos de los residuos acilados de GDH pueden ser acetilados o succinilados, pero algunos de los sitios de succinilación identificados son distintos de los sitios conocidos de acetilación (Du *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2013). Las succiniltransferasas mitocondriales no han sido identificadas todavía. Sin embargo, se sabe que la desuccinilación está catalizada por la desuccinilasa mitocondrial dependiente de NAD^+ , sirtuína 5 (SIRT5), que también posee otras actividades de desacilación (Du *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2014).

1.5.7 Regulación transcripcional

Los factores de transcripción son proteínas de unión al ADN que se unen a secuencias de ADN específicas en los elementos reguladores de un gen. Usualmente, las regiones de control pueden encontrarse corriente arriba del inicio de transcripción, aunque en algunos casos la unión se da en la región codificante.

Los factores de transcripción se unen a su secuencia diana en el ADN, interactuando con la maquinaria transcripcional y permite la regulación y la expresión selectiva del gen. Frecuentemente estos procesos están gobernados por la unión de diferentes proteínas a su dominio de unión en el ADN, permitiendo el control de la expresión génica. Un nivel adicional de complejidad es dado mediante la interacción proteína-proteína entre los factores de transcripción y los coactivadores o corepresores. Juntamente con la maquinaria transcripcional, estas proteínas forman un complejo multiproteico que permite la regulación de la síntesis del ARNm (Sandelin, 2004; Wasserman and Sandelin, 2004).

Actualmente son escasos los estudios sobre el control de la expresión de la GDH a nivel transcripcional. En estudios anteriores se indicó la presencia de posibles lugares de unión en el promotor de GDH para factores transcripcionales, tales como Sp1, AP-1, y AP-2 en humanos, y Sp1 y Zif268 en ratas (Das *et al.*, 1993; Michaelidis *et al.*, 1993). La confirmación de los elementos reguladores presentes en o cerca del gen *gdh* es necesario para proporcionar una mayor clarificación de la regulación de la expresión de GDH. Esto ayudará a dilucidar la expresión heterogénea en el hígado adulto, así como a entender la expresión hepática durante el desarrollo y en respuesta al estado hormonal alterado. Además, la identificación de estos elementos reguladores debería ayudar a comprender la expresión de GDH en otros órganos y en procesos tales como la expresión incrementada en el riñón en la acidosis metabólica (Kaiser *et al.*, 1992; Spanaki and Plaitakis, 2012) o la expresión reducida que puede estar asociada con ciertas enfermedades neurodegenerativas (Plaitakis, Berl and Yahr, 1984; Chokroverty *et al.*, 1990; Spanaki *et al.*, 2012). El aislamiento y la caracterización del promotor del gen GDH, es un primer paso en el estudio de los procesos primarios implicados en la expresión de GDH.

1.6 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN USF

La familia de factores de transcripción *upstream stimulatory factor* (USF) se identificó por primera vez en células humanas debido a su implicación en la regulación de la transcripción del promotor de adenovirus (Carthew, Chodosh and Sharp, 1985; Sawadogo and Roeder, 1985). La purificación completa de USF, a partir de núcleos de células *HeLa* dio dos polipéptidos relacionados de 43 y 44 kDa (Sawadogo *et al.*, 1988). El análisis de la secuencia de las proteínas 43 y 44 kDa dio como resultado la identificación de dos genes, USF-1 y USF-2 respectivamente (Gregor, Sawadogo and Roeder, 1990; Sirito *et al.*, 1992, 1994). Se han identificado genes ortólogos de USF-1 en varias especies, incluyendo levaduras (Atchley and Fitch, 1997), erizo de mar (Kozlowski *et al.*, 1991), ratones (Henrion *et al.*, 1995), *Xenopus* (Kaulen *et al.*, 1991), y rata (Galibert *et al.*, 1997). El análisis de secuencias ha revelado que USF-1 está evolutivamente bien conservado con *Xenopus* y con el erizo de mar, mostrando una identidad del 88%, mientras que el ADNc de USF-1 humano y el ADNc de USF-1 de rata y ratón muestran hasta un 90% de identidad. La similitud es aún mayor en la secuencia de proteínas, con aproximadamente un 99% de identidad entre ratón, rata y humano (Galibert *et al.*, 1997). Se observaron resultados comparables para los genes ortólogos de USF-2 (Lin, Luo and Sawadogo, 1994; Henrion *et al.*, 1995). Sin embargo, los ADNc de USF-1 murino y USF-2 guardan una identidad del 59% (Figura 9A) (Lin, Luo and Sawadogo, 1994; Sirito *et al.*, 1994).

Shieh y colaboradores (1993) localizaron el gen USF-1 humano en el cromosoma 1 (1q22-q23) y en ratones también se asignó USF-1 al cromosoma 1 (Henrion *et al.*, 1995). Los genes humanos y murinos USF-2 se asignaron a los cromosomas 19 y 7 respectivamente (Groenen *et al.*, 1996). En los mamíferos, los genes USF-1 y USF-2 presentan una organización genómica similar, cada uno contiene 10 exones (Figura 9A) con una amplitud de secuencia de 4 kb para USF-1 y 10 kb para USF-2 (Lin, Luo and Sawadogo, 1994; Henrion *et al.*, 1995; Viollet *et al.*, 1996). Ambos promotores carecen de caja TATA. Sin embargo, contienen iniciador (Inr) consistente en la secuencia consenso Inr de pirimidina (YYAYTCYYY) (Breathnach and Chambon, 1981; Smale and Baltimore, 1989). Además, el promotor del gen USF-2, pero no el de USF-1, se caracteriza por la presencia de dos motivos E-box situados a -332 y -186 desde el sitio de

inicio de la transcripción, permitiendo potencialmente la regulación del gen USF-2 por factores USF (Lin, Luo and Sawadogo, 1994; Sirito *et al.*, 1998) (Lin *et al.*, 1994, Sirito *et al.*, 1998).

1.6.1 Estructura de USF-1 y USF-2 e interacción con otras proteínas

USF-1 y USF-2 son miembros de la familia de proteínas *Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper* (bHLH-LZ) (Figura 9C) (Atchley and Fitch, 1997). Estos incluyen Myc (Murre *et al.*, 1989) y los factores de la subfamilia Myc, Max (Blackwood and Eisenman, 1991), Mad (Ayer, Kretzner and Eisenman, 1993) y Mxi1 (Zervos, Gyuris and Brent, 1993), y los factores altamente relacionados TFEB (Carr and Sharp, 1990), TFEC (Yasumoto and Shibahara, 1997) y TFE3 (Beckmann, Su and Kadesch, 1990).

Las proteínas bHLH-LZ tienen un dominio de unión al ADN altamente conservado, compuesto por una región básica (b), seguido por un *helix-loop-helix* (HLH) y un motivo de cremallera de leucina (LZ) (Figura 9B). Las regiones b-HLH-LZ de USF-1 y USF-2, tienen una identidad del 70%, mientras que la proteína completa presenta sólo una identidad del 44% (Sirito *et al.*, 1994). Sólo en el dominio N-terminal, se podría encontrar una homología limitada entre USF-1 y USF-2. Se ha demostrado que esta región específica de USF denominada USR y codificada por el exón 6 es esencial para la activación de la transcripción (Groenen *et al.*, 1996; Luo and Sawadogo, 1996; Qyang *et al.*, 1999), aunque su funcionamiento es desconocido. La presencia de los dominios HLH y LZ contiguos distingue estas proteínas de las proteínas bHLH (por ejemplo, la familia MyoD, E2A) (Blackwell and Weintraub, 1990; Kophengnavong, Michnowicz and Blackwell, 2000), los factores de transcripción bZip (por ejemplo, c-jun y c-fos) (Busch and Sassone-Corsi, 1990) y de otros factores de transcripción relacionados que carecen de una región básica (Benezra *et al.*, 1990).

La región básica está implicada en la interacción con la secuencia consenso *E-box* CANNTG del ADN (Baxevanis and Vinson, 1993), mientras que los dominios HLH y LZ están implicados principalmente en la dimerización, aunque la integridad LZ es esencial para la unión específica y de alta afinidad (Sha *et al.*, 1995). Por lo tanto, las hélices α de HLH y de LZ median conjuntamente la formación de dímeros. En consecuencia, se pensó que las interacciones de proteínas estaban limitadas a los

miembros de cada subgrupo de la familia b-HLH y b-HLH-LZ (Baxevanis and Vinson, 1993; Ciarapica *et al.*, 2003) debido a la especificidad del reconocimiento. Por lo tanto, se mostró que USF-1 y USF-2 interaccionaban solos o entre sí, dando lugar a formación de homo y heterodímeros (Sirtio *et al.*, 1992, 1994). Recientemente, se ha descrito que USF-1 se asocia *in vivo* con Fra1, un miembro de la familia de proteínas b-Zip, para promover la transcripción, demostrando una interacción entre miembros distantes de la familia de proteínas (Pognonec *et al.*, 1997). También se ha demostrado que el factor de transcripción Cha, miembro de la familia bHLH interactúa *in vivo* e *in vitro* con USF-1. El dímero de Cha/USF-1 puede unirse a un motivo de *E-box*, inhibiendo la actividad del promotor de USF-1 y por lo tanto regulando negativamente la transcripción dependiente de USF (Rodríguez, Gironès and Fresno, 2003).

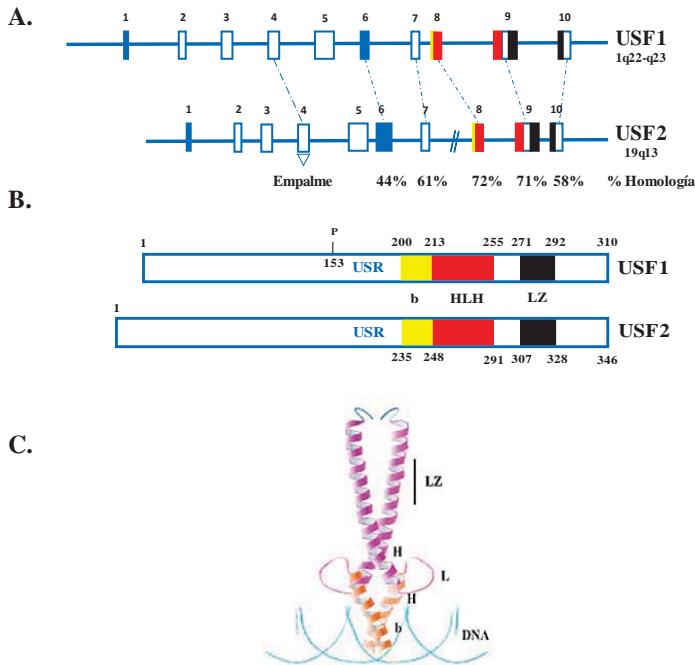


Figura 9. Estructura del gen y proteína del *upstream stimulating factor* (USF). (A) Los genes USF-1 y USF-2 constituyen 10 exones. Las secuencias en color corresponden al dominio básico (amarillo), a los dominios *Helix-Loop-Helix* (rojo) y *Leucine-Zipper* (negro) del dominio b-HLH-LZ. (B, C) USF-1 y USF-2 pertenecen a la familia de factores de transcripción b-HLH-LZ y muestran una estructura proteica similar. El dominio USR (región específica de USF), situado corriente arriba de la región básica, es esencial para la activación transcripcional de promotores que contienen tanto la caja TATA como el elemento iniciador Inr. Adaptado de Corre y colaboradores (2005).

La expresión génica dependiente de USF también se regula negativamente mediante la interacción con la variante de empalme USF-2, denominada USF-2b (Figura 9A) (Viollet *et al.*, 1996; Howcroft *et al.*, 1999). La variante USF-2b carece del exón 4, que contiene un dominio regulador positivo adicional, mientras que el USF y el dominio regulador negativo permanecen funcionales. La variante USF-2b forma complejos heterodiméricos con las proteínas USF, que pueden unirse al motivo E-box pero no promover la activación génica. La variante USF-2b es, por lo tanto, un regulador negativo dominante de la expresión génica dependiente de USF. De forma similar, eventos de empalme alternativos también afectan al ARNm de USF-1 (Gregor, Sawadogo and Roeder, 1990; Gao *et al.*, 1997; Saito *et al.*, 2003). La delección de una parte del exón 4 genera una nueva isoforma USF-1, dando lugar a nuevos complejos heterodiméricos que pueden modular la regulación de genes dependientes de USF (Saito *et al.*, 2003).

1.6.2 Propiedades de unión al ADN

El principal sitio de unión de los factores de transcripción que pertenecen a la familia b-HLH y b-HLH-LZ son los motivos *E-box*. La secuencia consenso del *E-box* es de sólo seis nucleótidos de largo, con algunas bases degeneradas. Aunque su corta secuencia favorece una amplia distribución sobre el genoma, sólo un conjunto restringido de motivos *E-box* han sido identificados como elementos de control de ADN (Dang *et al.*, 1992; Blackwell *et al.*, 1993; Galibert *et al.*, 1993; Aksan and Goding, 1998).

En general, los factores de transcripción b-HLH-LZ se unen a la secuencia *E-box* CANNTG en donde los dos nucleótidos centrales (NN) son en la mayoría de los casos GC o CG. Al alterar el espaciamiento con CA o TG se dificulta la unión. Por lo tanto, la conservación de la secuencia palindrómica corta es importante. Incluso una variación de nucleótidos favorece la unión de una de las isoformas de USF. Por ejemplo, USF-1 tiene una mayor afinidad de unión para el motivo CACGTG que para el motivo CATGTG (Ferré-D'Amaré *et al.*, 1994).

Es importante destacar que los nucleótidos que flanquean la secuencia CANNTG también pueden afectar significativamente la selectividad de las diferentes proteínas de unión a *E-box*. Un residuo de T-5' es crítico para la unión de Mitf al motivo CATGTG (Aksan and Goding, 1998), mientras que impide la unión de Myc a los elementos de

CACGTG (Fisher *et al.*, 1993). De forma similar, los sitios de unión de varios promotores regulados por USF-1 (Sawadogo and Roeder, 1985), metalotioneína I (Andrews *et al.*, 2001), ADN topoisomerasa III α (Han *et al.*, 2001) y desoxicitidina quinasa (Ge *et al.*, 2003) entre otros, poseen residuos AC-3'. Por lo tanto, el requerimiento para residuos particulares que flanquean el *E-box* central puede proporcionar un mecanismo *in vivo* para reclutar sólo subconjuntos específicos de factores de unión a *E-box*. A pesar de estas observaciones sobre la especificidad de secuencias, en algunos contextos los factores de transcripción de USF pueden unirse y activar la transcripción a partir de secuencias *E-box* degeneradas, donde sin duda el contexto del promotor dicta las interacciones proteína-proteína.

1.6.3 Expresión de USF

Aunque la expresión de las proteínas USF-1 y USF-2 es ubicua (Gregor, Sawadogo and Roeder, 1990; Sirito *et al.*, 1992, 1994), se encuentran distintas relaciones entre homodímeros y heterodímeros de USF en diferentes tipos celulares (Sirito *et al.*, 1994; Viollet *et al.*, 1996). Aunque los dímeros de USF tienen propiedades similares de unión al ADN, pueden controlar diferentes genes diana, estableciendo interacciones específicas con diferentes factores de transcripción a través de sus distintos dominios N-terminales (Kirschbaum, Pognonec and Roeder, 1992). Por lo tanto, las funciones celulares de los diferentes miembros de la familia USF pueden no ser completamente redundantes (Casado *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la interacción entre USF y los factores de transcripción generales y específicos de células Sp1, Pea3 y MTF1, por ejemplo, conduce a la regulación transcripcional cooperativa (Corre and Galibert, 2005).

En general, estos datos sugieren que USF es un factor de transcripción crucial, con múltiples funciones durante la regulación de la transcripción, en consonancia con su expresión ubicua y amplia distribución de su secuencia motivo *E-box* en el genoma. De hecho, el número de genes dependientes de USF es grande y algunos desempeñan un papel crítico durante el desarrollo y en la etapa adulta. Ratones con un doble *knock-out* en USF-1/USF-2 muestran un fenotipo embrionario letal, lo que sugiere que una mínima actividad USF es esencial para el desarrollo embrionario (Sirito *et al.*, 1998; Casado *et al.*, 1999; Corre and Galibert, 2005).

1.6.4 USF en el metabolismo de glúcidos-lípidos

Además de sus múltiples funciones en la regulación de la proliferación, una función adicional de los factores USF está en el control del metabolismo de glúcidos y lípidos (Figura 10), donde regulan un amplio número de genes caracterizados por la presencia de motivos *E-box* en sus regiones promotoras.

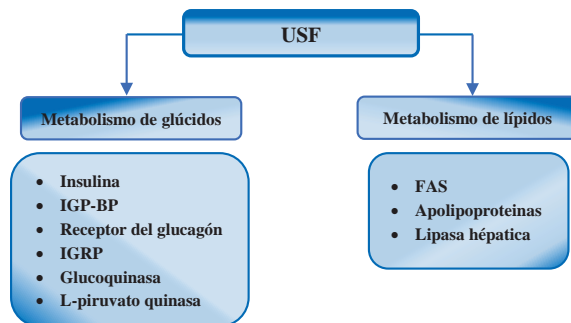


Figura 10. USF en el metabolismo de glúcidos y lípidos. Adaptado de Corre y Galibert (2005)

Los USFs participan en la regulación de la expresión del gen de la insulina (Read, Clark and Docherty, 1993), la proteína de unión al factor de crecimiento de la insulina tipo 1 (IGF-BP1) (Matsukawa *et al.*, 2001), el receptor del glucagón (Martin *et al.*, 2003a) y GK, que son elementos críticos en la detección de la glucosa hepática (Iynedjian, 1998), así como el gen de la subunidad catalítica de la G6Pasa (Martin *et al.*, 2003a; Roth, Jungermann and Kietzmann, 2004). Además, se ha demostrado la implicación de los factores USF en la regulación del gen PK (Vallet *et al.*, 1997, 1998). USF-1 también está muy involucrado en la lipogénesis, la regulación de la FAS, apolipoproteínas, lipasa hepática, acetil-CoA y carboxilasas. Por último, la hiperlipidemia combinada familiar, caracterizada por niveles elevados de colesterol total y/o triglicéridos, se asoció a mutaciones al gen USF-1 (Pajukanta *et al.*, 2004; Coon *et al.*, 2005). Estudios adicionales sugieren la asociación de USF-1 a otras enfermedades, como la diabetes tipo 2 (Elbein *et al.*, 1999; Putt *et al.*, 2004).

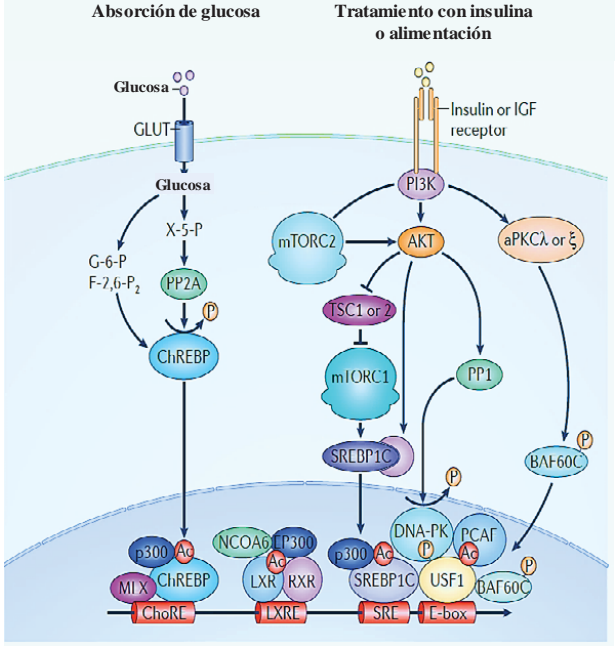
1.6.4.1 USF durante el ciclo de alimentación y ayuno

Los niveles de USF no parecen cambiar durante el ciclo de alimentación y ayuno en mamíferos. No obstante, los USFs se unen a dominios *E-box* en las regiones promotoras de FAS y de genes que codifican otras enzimas lipogénicas, tales como glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial (mGPAT), en función de la condición nutricional (Paulauskis and Sul, 1989; Shin *et al.*, 1991). Esto sugiere que modificaciones post-traduccionales de USF pueden ocurrir durante la alimentación y en ayuno. De hecho, el análisis de espectrometría de masas de extractos nucleares hepáticos de ratones alimentados y en ayuno reveló en ratones alimentados la fosforilación de la Ser262 y la acetilación Lys237 de USF1 (Wong and Hei, 2009; Wong *et al.*, 2009). La activación del promotor FAS fue mayor con las formas mutantes Ser262Asp y Lys237Ala de USF1, que imitan hiperfosforilación e hiperacetilación, respectivamente. Por el contrario, los mutantes Ser262Ala y Lys237Arg, que imitan la desfosforilación y la desacetilación, respectivamente, no pueden activar eficazmente el promotor Fas. Estos estudios demostraron claramente la importancia de la fosforilación de Ser262 y la acetilación de Lys237 para la función de USF en la activación transcripcional tras la alimentación o el tratamiento con insulina (Figura 11B).

La proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK) puede fosforilar USF1 en S262 *in vitro*, así como *in vivo* después de la alimentación o tratamiento con insulina. La modificación postraducciona de USF1 también ha sido implicada en la supresión de la gluconeogénesis. USF1 es activado por la proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK), estimulando la transcripción hepática de la tirosina fosfatasa un inhibidor de SHP (también conocido como NR0B2), lo que promueve la supresión de la transcripción de la PEPCK y la subunidad catalítica de la G6Pasa, lo que reduce la producción de glucosa (Chanda *et al.*, 2009).

Estos estudios sugieren que los USFs fosforilados por ADN-PK pueden participar en la coordinación de los cambios en la lipogénesis y la gluconeogénesis durante el ciclo de ayuno-alimentación (Figura 11).

A.



B.

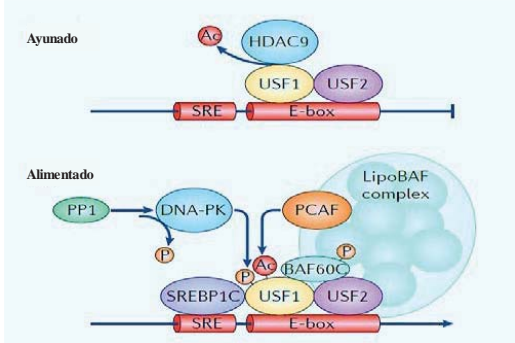


Figura 11. A. Factores de transcripción, co-reguladores y vías de señalización para la activación de los genes para el metabolismo de glúcidos-lípidos por insulina y glucosa. **B.** Modificación del *upstream stimulatory factors* (USFs) durante el ciclo de alimentación y ayunas. Adaptado de Wang y colaboradores (2015).

1.7 Factor de transcripción MYB

1.7.1 Estructura de la familia de proteínas MYB

MYB funciona principalmente como un activador transcripcional mediante la unión a la secuencia *t/cAACT/gG*, que se conoce como el sitio de unión MYB (MBS) (Biedenkapp *et al.*, 1988). La unión de menor afinidad ocurre en secuencias que varían en su mayoría en los dos últimos nucleótidos, y mientras que los genes diana en su mayoría tienen grupos de dos o más MBS (Ramsay and Gonda, 2008), se ha reportado que la activación por MYB es independiente de la unión al ADN (Foos, Natour and Klemptner, 1993; Kanei-Ishii *et al.*, 1994). El principal producto de traducción del proto-oncogén *c-myb* es una proteína nuclear de 75 kD con 636 aminoácidos que se expresa en la mayoría de los tejidos hematopoyéticos (Westin *et al.*, 1982; Oh and Reddy, 1999). El gen *c-myb* es un homólogo celular de los oncogenes *v-myb* (viral-Myb) encontrados en dos virus de la leucemia de pollo, el virus de la mieloblastosis aviar (AMV) y el virus E26 (Figura 12A y 12B) (Zhou and Ness, 2011).

Las proteínas *v-Myb* y *c-Myb* (Myb celular) comparten un dominio de unión al ADN altamente conservado cerca del extremo N, que también se encuentra en las proteínas relacionadas A-Myb (MYBL1) y B-Myb (MYBL2) (Figura 12C). Un segundo dominio conservado, es el dominio TPTPF en la Figura 1, también es compartido por las proteínas *c-Myb*, A-Myb y B-Myb, pero tiene una función desconocida. Comparado con *c-Myb*, la proteína *v-Myb* de AMV tiene truncamientos en las regiones N y C terminales y tiene once mutaciones puntuales que provocan cambios en los aminoácidos. Varios tipos de ensayos biológicos y de activación génica han demostrado que todas las mutaciones adquiridas por *v-Myb* contribuyen a su oncogenicidad y su distinta actividad transcripcional, en comparación con *c-Myb* (Dini, Eltman and Lipsick, 1995; Lei *et al.*, 2004). En cada caso, los truncamientos C-terminales son importantes para la actividad oncogénica, lo que sugiere que el dominio C-terminal de *c-Myb* suprime la actividad transformante (Gonda *et al.*, 1987; Gonda, Buckmaster and Ramsay, 1989).

La región C-terminal de *c-Myb* contiene varios dominios altamente conservados (Figura 1). Estos incluyen el dominio de activación transcripcional (TAD) requerido para

la activación de la expresión génica (Dubendorff *et al.*, 1992; Wang and Lipsick, 2002), el dominio FAETL que se requiere para la actividad oncogénica (Fu and Lipsick, 1996), el dominio TPTPF conservado en las otras proteínas MYB y el dominio EVES que está involucrado en interacciones intra-moleculares y regulación negativa (Dash, Orrico and Ness, 1996). También hay regiones ricas en prolina que pueden estar involucradas en cambios conformacionales catalizados por peptidil-prolisomerasas (Leverson and Ness, 1998; Pani *et al.*, 2008). Por lo tanto, el dominio C-terminal tiene múltiples componentes funcionales implicados en la regulación tanto de la especificidad como de la actividad de c-Myb.

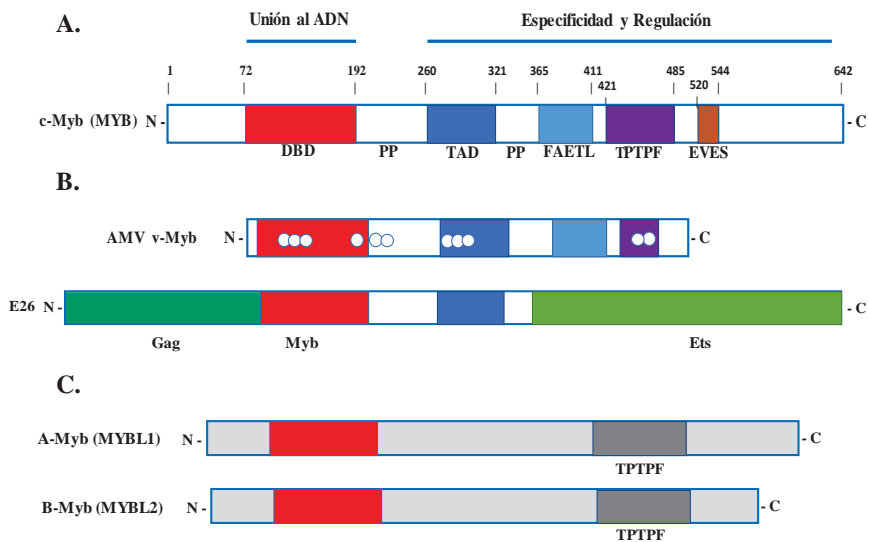


Figura 12. Estructura y dominios conservados de MYB. (A) La estructura de la proteína c-Myb se muestra, con el extremo N-terminal a la izquierda y el C-terminal a la derecha. Los dominios que están más conservados están sombreados y los residuos de aminoácidos están numerados por encima del diagrama, incluido el dominio de unión al ADN (rojo) cerca del extremo N. Los dominios conservados están denominados como DBD, TAD, FAETL, TPTPF, EVES y PP. (B) Estructuras de las proteínas v-Myb oncogénicas codificadas por virus de mieloblastosis aviar (AMV) y virus E26. La proteína AMV tiene 6 aminoácidos derivados de la proteína Gag retroviral fusionada a los aminoácidos 72-442 de c-Myb, fusionados a 13 nuevos aminoácidos no Myb en el C-terminal (gris sombreado). También tiene once mutaciones puntuales que lo distingue de c-Myb, indicado por puntos blancos. La proteína E26 es una fusión Gag-Myb-Ets, tal como se indica (las regiones no Myb están sombreadas de color oscuro y verde claro, respectivamente); (C) Diagramas de las estructuras de las proteínas relacionadas A-Myb (MYBL1) y B-Myb (MYBL2). Estas proteínas son más similares a c-Myb en los dominios de unión al ADN conservado (rojo) y en los dominios TPTPF conservados (gris oscuro). Adaptado de George OI y Ness SA (2014).

1.7.2 MYB: Regulador de expresión de genes

La proteína c-Myb se expresa altamente en células hematopoyéticas inmaduras, tanto en las líneas mieloides como linfoides, y los niveles de expresión disminuyen a medida que las células se diferencian (Ness, 1996; Zhou and Ness, 2011). Aunque la actividad de la proteína c-Myb no se requiere para la hematopoyesis inicial, es esencial para la hematopoyesis fetal, debido a que, se ha observado que el *knock-out* del gen MYB conduce a la letalidad embrionaria (Mucenski *et al.*, 1991).

Aunque MYB se describe a veces como específico para los linajes hematopoyéticos, en realidad está involucrado en la diferenciación, desarrollo y mantenimiento de muchos tipos de células no hematopoyéticas, especialmente las células epiteliales en el intestino, el riñón y la glándula mamaria (Zorbas *et al.*, 1999; Drabsch *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2009; Quintana *et al.*, 2011), así como las células del músculo liso (Kolodziejaska *et al.*, 2008) y algunas células madres neurales (Malaterre *et al.*, 2008). Se cree que las proteínas MYB están reguladas por las vías de señalización de Wnt, y pueden desempeñar un papel importante en los cambios en la expresión génica que ocurren durante el envejecimiento (Hofmann *et al.*, 2014). Por lo tanto, la proteína c-Myb parece estar implicada en la regulación de la expresión génica y la diferenciación en una amplia variedad de tejidos. Sin embargo, experimentos de *microarrays* han demostrado que c-Myb sobreexpresado activa diferentes genes en diferentes tipos de células, lo que sugiere que la elección de los genes diana está determinada, al menos en parte, por el contexto celular (Rushton *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2004).

Quintana y colaboradores (2011), demostraron mediante la técnica de *ChiP on ChiP* y *ChiP* seguido de secuenciación (ChiP-seq), que c-Myb está ligado a un gran número de genes, identificando aproximadamente 8,000 sitios de unión para este factor de transcripción. Los resultados sugieren que c-Myb está ligado a complejos grandes y a diversos genes diana. Sin embargo, estudios anteriores de *arrays* identificaron alrededor de 250 genes cuyos niveles de expresión cambiaron cuando c-Myb o v-Myb se sobreexpresaron en células MCF -7 (Rushton *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006). Estos estudios demuestran que c-Myb se une tanto a los promotores como a las secuencias *enhancer* donde c-Myb está implicado en la regulación de las interacciones de largo alcance entre promotores y elementos reguladores distantes (Wilczek *et al.*, 2009).

MYB probablemente trabaje junto con otros co-reguladores específicos de tipo celular para activar genes diana. La presencia o ausencia de diferentes co-reguladores en diferentes tipos de células determina qué genes diana pueden ser regulados por MYB. Este concepto condujo a un modelo de cómo las proteínas MYB podrían ser reguladas durante la diferenciación y en diferentes tejidos, a través de un código de interacción proteína-proteína (Rushton *et al.*, 2003). Por ejemplo, c-Myb interactúa y coopera con la proteína de unión CREB-coactivador transcripcional, o CBP, y la proteína p300. Tanto CBP como p300 conservan dominios de interacción proteína-proteína llamados dominios KIX que se unen al dominio de activación transcripcional MYB (TAD) (Tomita *et al.*, 2000; Zor *et al.*, 2004). Además, es probable que las interacciones entre MYB y otros factores de transcripción estén reguladas por modificaciones postraduccionales que estabilizan o interrumpen las interacciones, y guían a MYB (y otros factores de transcripción) para formar complejos estables en promotores específicos (George and Ness, 2014). Por lo tanto, las mutaciones en MYB que alteran estas interacciones proteína-proteína, como las mutaciones en las variantes oncogénicas como v-Myb, conducirían a cambios en los genes objetivo que están regulados. Del mismo modo, los cambios en las vías de transducción de señales que conducen a diferentes modificaciones postraduccionales en MYB, o los co-reguladores, también conducirían a cambios en la expresión génica. Estos tipos de cambios también pueden ocurrir durante el ciclo celular, lo que permite a MYB regular diferentes genes diana en diferentes partes del ciclo celular debido a los cambios específicos de la etapa en las modificaciones postraduccionales.

1.7.3 MYB en metabolismo celular

El crecimiento de una célula de mamífero normal depende de la señalización del factor de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes (Cantor and Sabatini, 2012; Dang, 2012). En ciertos modelos celulares, las células en reposo usan la oxidación de los ácidos grasos como un medio para generar ATP, mantener los potenciales de la membrana y convertir orgánulos. A medida que la célula es inducida a crecer, la glucólisis y la glutaminólisis se inducen a través de una mayor expresión de glucosa y transportadores de aminoácidos (Vander Heiden, 2011; Cantor and Sabatini, 2012; Dang, 2012). En este sentido, estudios previos en doradas demostraron que c-Myb y p300 regulan la expresión del gen que codifica a la ALT citosólica en hígado de peces sometidos a inanición (Anemaet *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Actualmente, uno de los principales objetivos en la acuicultura está dirigido a minimizar la cantidad de proteína en la dieta suministrada a los peces en cultivo y reemplazarla, parcialmente, por carbohidratos y nutrientes más económicos de origen no marino, los cuales cubrirían las necesidades energéticas (ARRAINA, 2016; FAO, 2016).

Dado que la expresión de GDH puede considerarse un marcador significativo para la utilización de proteínas y la excreción de amoníaco en los peces (Liu *et al.*, 2012), el conocimiento de la regulación de la expresión de esta enzima en peces puede ser beneficioso desde un punto de vista biotecnológico y biomédico. En piscicultura, la identificación de mecanismos que controlan la regulación de la transcripción de GDH y la determinación de la función de GDH podrían ayudar a diseñar estrategias biotecnológicas para promover un efecto ahorro de proteínas en la dieta y favorecer la producción de energía por carbohidratos. Esta intervención podría contribuir, por una parte, a reducir el coste de la producción de peces en cultivo, y por otro, a la disminución de la eutrofización de las aguas causada por el incremento en la excreción de compuestos nitrogenados procedentes de la utilización de los aminoácidos como fuente de energía.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Para estudiar los mecanismos de regulación transcripcional de GDH y el rol que desempeña esta enzima en el metabolismo en un pez de elevado interés comercial como es la dorada, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- A) Clonar y caracterizar el ARNm que codifica a la GDH de *S. aurata*.
- B) Clonar y caracterizar el promotor del gen *gdh* de *S. aurata*.
- C) Estudiar la distribución tisular y la regulación nutricional de la expresión de GDH.
- D) Analizar el efecto metabólico del silenciamiento génico de GDH en hígado de *S. aurata* mediante sh-ARNs (*short-hairpin* ARNs).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

3.1 LA DORADA

La dorada (*Sparus aurata*) es un teleósteo que pertenece a la familia *Sparidae*, del orden de los Perciformes. Tiene el cuerpo en forma oval y comprimido, y se caracteriza por la presencia de una franja dorada, situada entre los ojos y una mancha oscura sobre el opérculo. Es una especie, euriterma (5-35 °C de temperatura), eurihalina (capaz de crecer en diferentes condiciones de salinidad) y hermafrodita proterándrica, que no se diferencia sexualmente hasta el primer año de vida; posteriormente, se comportan como machos durante 2-3 años y se diferencian finalmente de manera definitiva a hembras.

Las doradas son propias del Mediterráneo. Se encuentra también en el Mar Negro, Mar Rojo y costas orientales del Atlántico, desde las islas británicas hasta Senegal. Generalmente se encuentran individuos solitarios o formando grupos reducidos, aunque cuando son jóvenes pueden reunirse en grupos más numerosos. Se encuentran a una profundidad que oscila entre los 30 y 150 m. Es de hábitos predadores, su dieta natural es preferentemente carnívora y consiste básicamente en la ingesta de proteína procedente de moluscos, crustáceos y peces pequeños.

3.1.1 Manipulación de los animales y toma de muestras

En el proceso de manipulación, se han seguido unas pautas concretas para evitar el estrés y situaciones de anoxia de los animales que podrían incidir en el resultado de los experimentos a realizar.

Las doradas utilizadas en nuestros estudios procedían de la piscifactoría Piscimar S.L. (Burriana, Castellón), perteneciente al grupo Andrómeda. En el laboratorio, las doradas se mantuvieron en acuarios con una capacidad de 260 litros de agua, ubicados en cámaras con control de temperatura, en el Departamento de Ecología de la Facultad de Biología en la Universidad de Barcelona. La temperatura del agua se mantuvo constante en los acuarios, a 21 ± 0.5 °C. La iluminación de cada cámara fue programada para un fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad. La salinidad del agua de cada acuario se mantuvo controlada a 3,5‰. Con el objetivo de garantizar niveles óptimos de oxígeno disuelto, los acuarios contaban con un suministro continuo de aire mediante compresores (400 L/h) (Stellar S-30, California, USA). Los residuos procedentes de las excreciones de

los peces o de la degradación del alimento no ingerido fueron eliminados u oxidados biológicamente a formas menos tóxicas bombeando el agua (1800 L/h) a través de un filtro externo tipo *Eheim professional 3* (Eheim, Deizisau, Alemania). Con la finalidad de esterilizar y controlar la carga microbiana del agua, cada acuario contaba con una lámpara ultravioleta *Eheim reeflexUV 800* (Eheim, Deizisau, Alemania) situada a la salida del filtro.

Las doradas tenían un peso inicial $10 \text{ g} \pm 2$. Se alimentaron suministrándoles una dieta comercial, en cantidades correspondientes al 5 % del peso corporal dos veces al día hasta alcanzar aproximadamente los 20 g, momento a partir del cual las doradas fueron alimentadas una vez al día con cantidades de dieta correspondientes al 4 % del peso corporal promedio de cada acuario. Los peces se pesaron cada dos semanas para ajustar periódicamente la cantidad de dieta suministrada.

Todas las manipulaciones se han realizado según las normas del Comité Ético de Experimentación con Animales de la Universidad de Barcelona (CEE-UB). El protocolo seguido en el momento de tomar las muestras pretende que los peces estén sometidos a un estrés mínimo. Antes de ser sacrificadas las doradas fueron anestesiadas con metasulfato de tricaina (MS-222, Sigma-Aldrich), disuelto en agua marina en una proporción de 70 mg/L (p/v).

PROTOCOLO:

Preparación

- 1.- Preparar un acuario de capacidad adecuada al tamaño y número de peces a sacrificar. Disolver el agente anestésico MS-222 en una proporción de 70 mg/L (p/v).
- 2.- Introducirlos inmediatamente, en grupos de 3 - 4 individuos como máximo, en el acuario con el anestésico.
- 3.- Esperar hasta que los peces queden sedados (5-10 minutos).
- 4.- Proceder a sacrificar y tomar las muestras o a inyectarlas con el compuesto en estudio.

Toma de muestras

- 1.- Sacrificar cada dorada mediante un corte cervical.
- 2.- Obtener la sangre con una pipeta Pasteur de vidrio previamente tratada con una solución de citrato sódico al 3 %.
- 3.- Abrir el pez ventralmente y extraer el hígado. Para eliminar restos de sangre o bilis, se lava el tejido en una solución de NaCl al 0.9 %. Se congela inmediatamente por la técnica de *freeze clamping*. El hígado se mantiene a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.
- 4.- La sangre obtenida se deja a temperatura ambiente 30 minutos, posteriormente se centrifuga a 6000 g a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 10 minutos. Se recupera el suero y se mantiene congelado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

3.1.1.1 Obtención de extractos hepáticos

El tejido hepático de dorada obtenido se pulverizó y congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización. Para pesar la cantidad necesaria se utilizaron tubos de vidrio previamente tarados y enfriados en nitrógeno líquido, para evitar la descongelación de las muestras. La solución de homogeneización T se utilizó para obtener el extracto total. Todas las manipulaciones efectuadas para la obtención de los extractos crudos se realizaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PROTOCOLO:

- 1.- Pesar 50-100 mg de tejido hepático y agregar rápidamente la solución de homogeneización T a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una relación 1:5 p/v (mg/ μL).
- 2.- Mantener las muestras en hielo y homogeneizarlas durante 30 segundos, utilizando un POLYTRON-PTA 7 en posición 3; se coloca el homogenado en tubos eppendorf.
- 3.- Centrifugar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos a 10000 g. para eliminar componentes sólidos insolubles.
- 4.- Recoger los sobrenadantes y cuantificar la proteína total siguiendo el método de *Bradford*, descrito en el apartado 3.21.

Solución de homogeneización T

Tampón Tris-HCL pH 7,5	50 mM
EDTA	4 mM
NaF	50 mM
Sacarosa	250 mM
PMSF	0,5 mM
DDT	1 mM

Esta solución se prepara 10X, sin sacarosa, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) o ditiotretol (DDT), que se agregan en el momento de diluir la solución para utilizarla en la obtención de extractos crudos; se guarda a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El PMSF se prepara 200 mM en n-propanol.

3.2 ELABORACIÓN DE DIETAS SEGÚN EL DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.1 Experimento 1: Regulación nutricional de la expresión de GDH

Para entender el efecto de la composición de la dieta sobre la expresión de ARNm de GDH en hígado de doradas, se formularon 3 dietas que varían en la composición de macronutrientes (proteína, lípidos y carbohidratos) manteniendo la cantidad de energía constante. Las dietas se denominan con la siguiente nomenclatura: HLL, LLH y MHL (Tabla 1). Cada letra indica el nivel relativo de macronutrientes (*High, Medium and*

Low), la primera letra se refiere a las proteínas, la segunda a los lípidos y la tercera a los carbohidratos. Por ejemplo: HLL indica altos niveles relativos de proteína, bajo de lípidos y bajo nivel de carbohidratos. Así también, para estudiar el efecto del ayuno y la realimentación sobre la expresión de GDH, se realizó proporcionando a los peces designados a la realimentación, una sola ración al día, del 2,5% del peso fresco de la dieta Microbaq 15 (Tabla 2).

Tras una semana de aclimatación en nuestras instalaciones en que los peces fueron alimentados a saciedad con la dieta Microbaq 15 (Dibaq Grupo, España) (Tabla 2), las doradas fueron pesadas y separadas en acuarios a razón de 20 – 25 peces/acuario. A partir de este momento a cada acuario se suministró una de las dietas indicadas anteriormente o bien fueron sometidos a ayuno durante un periodo de 19 días y realimentadas a las 6 horas, 24 horas, 5 días y 24 días. Durante el periodo de alimentación, los peces fueron alimentados a una ración diaria del 2,5% del peso fresco de lunes a viernes suministrando el alimento una vez a la mañana (9:30) y otra por la tarde (15:30). Al finalizar el experimento se recolectaron las muestras de sangre e hígado.

Tabla 1 Composición y análisis proximal de las dietas experimentales

DIETAS	HLL	MHL	LLH
Formulación %			
Harina de pescado *	81,62	67,55	54,35
Almidón †	15,00	16,70	37,06
Aceite de pecado §	0,76	13,13	5,97
Mezcla de minerales ¶	0,90	0,90	0,90
Mezcla de vitaminas ¶	0,22	0,22	0,22
Carragenano q	1,50	1,50	1,50
Energía bruta (Kj/g dw)	20,1	22,4	19,9
Análisis químico (% peso seco)			
Proteína cruda	58,0	48,0	38,6
Grasas	9,9	20,7	12,1
Carbohidratos**	15,0	16,7	37,1
Cenizas ∅	15,4	12,9	10,5

*Corpesca S.A. *Super-Prime fish meal* (Santiago de Chile, Chile)

†Almidón pregelatinizado de maíz adquirido en Brentang Químmica (Barcelona, España)

§A.F.A.M.S.A.

¶Mezcla mineral (mg/Kg): CaHPO₄·2H₂O, 7340; MgO, 800; KCl, 750; FeSO₄·7H₂O, 60; ZnO, 30; MnO₂, 15; CuSO₄·5H₂O, 1,7; CoCl₂·6H₂O, 1,5; KI, 1,5; Na₂SeO₃, 0,3.

¶Mezcla de vitaminas (mg/Kg): Cloruro de colina, 1200; mio-inositol, 400; ácido ascórbico, 200; ácido nicotínico, 70; acetato de alfa tocoferol, 60; pantotonato de calcio, 30; riboflavina, 15; piridoxina, 10; ácido fólico, 10; menadiona, 10; tiamina-HCl, 8; trans retinol, 2; biotina, 0,7; colecalciferol, 0,05; cianocobalamina, 0,05.

qLota carrageenan (sigma)

**Los carbohidratos fueron calculados por diferencia (100-% proteína cruda - % lípidos - % cenizas).

∅Calculado a partir de la composición (proteína 24 kj/g, lípidos 39 kj/g, carbohidratos 17 kj/g).

Tabla 2 Composición y análisis proximal de la dieta comercial Microbaq 15

Microbaq 15	
Formulación (%)	
Harina de pescado	58,10
Maíz	12,50
Aceite de pescado	13,50
Proteína de arroz	6,0
Minerales	1,7
Proteína de soja	2,2
Concentrado soluble de pescado	5,5
Energía bruta (Kj/g dw)	21,1
Total	100
Análisis químico (% peso seco)	
Proteína	46,0
Lípidos	22,0
Carbohidratos	9,5
Humedad	12,5
Cenizas	10,0
Total	100

γ Mezcla de vitaminas (mg/Kg): Cloruro de colina, 1200; mio-inositol, 400; ácido ascórbico, 200; ácido nicotínico, 70; acetato de alfa tocoferol, 60; pantetonato de calcio, 30; riboflavina, 15; piridoxina, 10; ácido fólico, 10; menadiona, 10; tiamina-HCl, 8; trans retinol, 2; biotina, 0,7; colecalfiferol, 0,05; cianocobalamina, 0,05.

3.2.2 Experimento 2: Efecto metabólico del silenciamiento génico de GDH

La GDH desempeña un papel fundamental en el metabolismo de los aminoácidos para obtener energía y proveer sustratos gluconeogénicos. A fin de analizar el efecto metabólico del silenciamiento génico de GDH en hígado de dorada y su relación sobre la utilización de los nutrientes de la dieta suministrada, se determinó el efecto que produce la sobre expresión génica de sh-ARNm diseñados para silenciar la expresión de GDH en hígado de peces alimentados con la dieta HLL. La inyección se realizó a única dosis e intraperitonealmente, de nanopartículas de quitosán-TPP acomplexados con un plásmido de expresión de los sh-GDH.

Para este estudio, tras una aclimatación de 19 días con la dieta Microbaq 15 (Diabaq Grupo, España), los peces una vez fueron pesados y distribuidos en acuarios (20 – 30 peces por acuario) se sometieron a una rutina de alimentación al 2,5% del peso fresco con la dieta HLL una vez al día durante 15 días. Después de 24 horas de la última ingesta, a 20 peces se le administraron por vía intraperitoneal 10 μ g/g de pez de plásmido pCpG-sh-GDH o pCpG-siRNA-scramble (como control), acomplexados con quitosán-TPP en solución de cloruro de sodio estéril al 0,09 %.

3.3 LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS

3.3.1 Lista de oligonucleótidos

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'
Alineamiento GDH	
MC205	GGTATCCACGGTCGTATCTCAGCC
MC206	GAGACCCACATTACCAAAGCCCTG
RACE-PCR	
CG1307	GTCTTGTCTGGAAGCCTGGTGTCA
CG1308	GGCTGAGATACGACCGTGGATACCTCC
CG1305	ACTTGAATGCTGGTGGTGTGACAGTGT
CG1306	CCCACCACCCAGATGCTGACAAGAT
Paseo cromosómico	
CG1315	GACAGGAGAAGGGGGGTAGAATGAACGAC
CG1316	AAACAACAAGGACAATGGGGGTGACGACAG
Clonación de ADNc	
CG1333	TTCCTTAAACACAATTTCACGTC
CG1334	GGAGCTGCTGTGTCGTTTCAT
CG1525	CCGGATCCACCATGTACCGGTATTTCGGGGAGC
CG1526	CCGGATCCACCATGGACCGTATTTCGGGGAG
CG1527	CCGAATTCGGCTGTTTAAAGGGGGGAGAATAG
CG1528	CCGGATCCTTCATTCTACCCCTTCTCCTG
CG1529	CCGAATTCCTTAAACACAATTTCACGTC
Constructos reporteros	
CG1344	CCCCGGGACACGGTGAGGAGCTGC
CG1345	CCCCGCTCTCCCGGTGAGTCCCG
CG1342	CCCAGCTGTCAAGTTGGACAGCACGG
CG1552	CTCTCCGGGCTCGTGTGCTGCTTTTAAAGCAAAGTACACAGT
EMSA	
CG1561	CACCCGGTCATGTGACCTACAC
CG1562	TGT AGG TCA CAT GAC CGG GTG G
CG1563	AAACTGACACAGCATGTCATTCCCACCTCGGC
CG1564	CCGAGTGGGGAATGACATGCTGTGTCAGTTTG
CG1565	AAACTGACACAGTTTTCATTCCCACCTCGGC
CG1566	CCGAGTGGGGAATGAAAACTGTGTCAGTTTG
sh-ARN	
CG1531	GTACCTCGTTCGTTTACACGGTTAGCTATCAAGAGTAGCT
CG1532	AACCGTGTAAACGAACTTTTGGAAA
CG1533	AGCTTTTCCAAAAAGTTCGTTTACACGGTTAGCTACTCTT
CG1534	GATAGCTAACCGTGTAAACGAAACGAG
CG1535	GTACCTCGGCATCATCAAGCCCTGTAATCAAGAGTTACA
CG1536	GGGCTTGATGATGCGCTTTTGGAAA
CG1537	AGCTTTTCCAAAAAGCGCATCATCAAGCCCTGTAATCTT
CG1538	GATTACAGGGCTTGATGATGCGCGAG
CG1539	GTACCTCGAGCCAAAGCTGGAGTCAAGATCAAGAGTCTTG
CG1540	ACTCCAGCTTTGGCTCTTTTGGAAA
CG1541	AGCTTTTCCAAAAAGGCAAAAGCTGGAGTCAAGACTCTT
CG1542	GATCTTGACTCCAGCTTTGGCTCGG
CG1543	GTACCTCGGAGACAACGTCATGTTTCAAGAGAATAAC
CG1544	CATGACGTTGTTCTTTTGGAAA
CG1545	AGCTTTTCCAAAAAGAGAACAACGTCATGTTTATTCTCTTG
CG1546	AAATAACCATGACGTTGTTCTCGAG
CG1547	GTACCTCGGCTGGACTTACCTTCACATATCAAGAGTATGTG
CG1548	AAGGTAAGTCCAGCCTTTTGGAAA
CG1549	AGCTTTTCCAAAAAGGCTGGACTTACCTTCACATCTCTTG
CG1550	ATATGTGAAGTAAGTCCAGCCGAG
RT-PCR	
JDR1pcmvbS	CCCATTACGGTCAATCCCG
JDR1pcmvbAS	ACAACCCGTCGGATTCTCC
MC109	CGGCTACCACATCCAAGGAA
MC110	GCTGGAATTACCCGGCT
CG1543	GGTATTTCGGGGAGCTGCTGAG
CG1544	CGCATCAGGGACGAGACA
CG1557	AGAGCTGAGGCAAGCAACC
CG1558	GGGAGGACGCATTCACATA
EF1 α -F	CCCAGCTGTTGCTCTCG
EF1 α -R	CAGCAGTGTGGTTCGGTTAGC
18s-F	TTACGCCATGTTGCTCTGAG
18s-R	AGGATTCGTCATGATGGTCACC
β -Actina-F	CTGGCATCACACCTTCTACAACGAG
β -Actina-R	GCGGGGGTGTGAAGGTCTC

3.3.2 Lista de plásmidos

Plásmidos de expresión

pcDNA₃: Vector de expresión eucariota *in vivo* e *in vitro*. Utilizado para la expresión y traducción *in vitro* de proteínas bajo la influencia del promotor T7 (Invitrogen).

pcDNA₃-GDH: Plásmido que expresa GDH de dorada. El ADNc codificante de GDH va ser obtenida por PCR utilizando los oligonucleótidos CG1525 y CG1527 y con el ADN molde del ADNc del hígado de dorada. El fragmento obtenido, fue digerido con *BamHI* y *EcoRI*, y posteriormente clonado al pcDNA₃ digerido previamente con las mismas enzimas.

pCMV-cMYB: Plásmido que expresa la proteína cMYB de rata (Oelgeschlager et al., 1995). Cedido por el Dr. Bernard Luscher (*Institut für Molekular biologie*, Hannover, Alemania).

pCR3-hUSF2a: Plásmido que expresa el factor de transcripción USF2a (North et al., 1999) Cedido por el Dr. B. Viollet (INSERM U 129, Paris, Francia).

pCR3-hUSF2b: Plásmido que expresa el factor de transcripción USF2b (North et al., 1999) Cedido por el Dr. B. Viollet (INSERM U 129, Paris, Francia).

Plásmidos reporteros

pGL3-*Basic*: Vector que carece de un promotor eucariota y secuencias *enhancer*. Permite el estudio de regiones promotoras de genes mediante el control de la expresión del gen reportero de luciferasa (Promega).

pCMV β : Vector utilizado como control de la eficiencia de las transfecciones realizadas en células en cultivo, este plásmido expresa β -galactosidasa en células eucariotas.

pGDH+19: El constructo pGDH+19 (+19 a +70) se generó por PCR utilizando como oligonucleótidos CG1344 y RVprimer3 (Promega) a partir de pGDH1286 como ADN molde. El fragmento resultante va ser digerido con *SmaI* y *HimIII* y ligados al pGL3-*Basic* digerido previamente con *MluI* (*filling-in*) y *HindIII*.

pGDH85: El constructo pGDH85 (-85 a +70) se generó por PCR utilizando como oligonucleótidos CG1345 y RVprimer3 (Promega) a partir de pGDH1286 como ADN molde. El fragmento resultante va ser digerido con *BsrBI* y *MluI* y ligados al pGL3-*Basic* digerido con *MluI* (*filling-in*) y *HindIII*.

pGDH128: El constructo pGDH128 (-128 a +70) se generó por PCR utilizando como oligonucleótidos CG1342 y RVprimer3 (Promega) a partir de pGDH1286 como ADN molde. El fragmento resultante va ser digerido con *PvuII* y *MluI* y ligados al pGL3-*Basic* digerido previamente con *MluI* (*filling-in*) y *HindIII*.

pGDH413: El constructo pGDH413 (-413 a +70) se obtuvo por restricción enzimática de pGDH1286 con las enzimas *NdeI* y *MluI*, posteriormente se realizó *filling-in* y se religó.

pGDH648: El constructo pGDH648 (-648 a +70) se generó por restricción enzimática de pGDH1286 con *PstI* y posterior *chew-back* y *Filling-in*. El producto obtenido fue digerido con *HindIII*, y posteriormente ligado al pGL3-*Basic* digerido previamente con *MluI* (*filling-in*) y *HindIII*.

pGDH982: El constructo pGDH982 (-982 a +70) se generó por restricción enzimática de pGDH1286 con *PstI* y posterior *chew-back* y *Filling-in*. El producto obtenido fue digerido con *HindIII*, y posteriormente ligado al pGL3-*Basic* digerido previamente con *MluI* (*filling-in*) y *HindIII*.

pGDH1286: El constructo pGDH1286 (-1286 a +70) se generó por restricción enzimática de pGEM-GDH2057 con *NotI* seguido por *Filling-in*. El producto obtenido fue digerido con *NheI*, y posteriormente ligado al pGL3-*Basic* digerido previamente con *SmaI* y *NheI*.

pGDH982mutUSF2: El constructo pGDH982mutUSF2 (-982 a +70; contiene un elemento de respuesta a USF2 mutada) se generó por PCR utilizando los oligonucleótidos CG1552 (con una mutación en el *E-box* y una diana en la región 5' para *Cfr42I*) y GLprimer2 (Promega) a partir de pGDH982 como ADN molde. El fragmento resultante se digirió con *Cfr42I* y ligado al pGDH982 digerido con *Cfr42I*.

pGDH982Δ-44/+70: El constructo pGDH982Δ-44/+70 (-982 a +70; con delección de los nucleótidos -44 a +70) se generó por digestión del pGDH982 con *Cfr42I* y posterior recirculación.

pGDH982Δ-708/-413: El constructo pGDH982Δ-708/-413 (-982 a +70; con delección de los nucleótidos -708 a -413) se generó por digestión del pGDH982 con *SacI* y *NdeI* posterior *filling-in* y recirculación.

pGDH982Δ-413/-278: El constructo pGDH982Δ-413/-278 (-982 a +70; con delección de los nucleótidos -413 a -278) se generó por digestión del pGDH982 con *NdeI* y *EcoRI* posterior *filling-in* y recirculación.

pGDH982Δ-278/-44: El constructo pGDH982Δ-278/-44 (-982 a +70; con delección de los nucleótidos -278 a -44) se generó por digestión del pGDH982 con *NdeI* y *CfrI* posterior *filling-in* y recirculación.

Plásmidos *knock-down*

pCpG-siRNA: Vector de expresión de sh-RNA en células eucariotas *in vitro* e *in vivo*. Se ha diseñado para la expresión de sh-RNA *in vivo*, ya que el vector no induce respuesta inflamatoria.

pCpG-scr: Vector que permite expresar un sh-RNA con bajo grado de homología con secuencias conocidas. Cortesía del Doctor José C. Perales, Departamento de Ciencias y Fisiología, Universidad de Barcelona.

pCpG-SH1-GDH: El constructo pGpG-SH1 (-30 a -20 del primer ATG) se generó por hibridación de los oligonucleótidos CG1531 y CG1532 (diseñados por los algoritmos del programa *siRNA Wizard software* de InvivoGen), y clonados en pCpG-siRNA digerido previamente con *Acc65I* y *HindIII*.

pCpG-SH2-GDH: El constructo pGpG-SH2 (+270 a +290 del primer ATG) se generó por hibridación de los oligonucleótidos CG1533 y CG1534 (diseñados por los algoritmos del programa *siRNA Wizard software* de InvivoGen), y clonados en pCpG-siRNA digerido previamente con *Acc65I* y *HindIII*.

pCpG-SH3-GDH: El constructo pGpG-SH3 (+494 a +514 del primer ATG) se generó por hibridación de los oligonucleótidos CG1535 y CG1536 (diseñados por los algoritmos del programa *siRNA Wizard software* de InvivoGen), y clonados en pCpG-siRNA digerido previamente con *Acc65I* y *HindIII*.

pCpG-SH4-GDH: El constructo pGpG-SH4 (+1207 a +1227 del primer ATG) se generó por hibridación de los oligonucleótidos CG1537 y CG1538 (diseñados por los algoritmos del programa *siRNA Wizard software* de InvivoGen), y clonados en pCpG-siRNA digerido previamente con *Acc65I* y *HindIII*.

pCpG-SH5-GDH: El constructo pGpG-SH5 (+1608 a +1628 del primer ATG) se generó por hibridación de los oligonucleótidos CG1539 y CG1540 (diseñados por los algoritmos del programa *siRNA Wizard software* de InvivoGen), y clonados en pCpG-siRNA digerido previamente con *Acc65I* y *HindIII*.

Otros plásmidos

pGEM-T *Easy*: Vector de tipo T que facilita la ligación de fragmentos de ADN obtenidos mediante amplificación por PCR (Promega).

pGEM-GDH2057: El constructo pGEM-GDH2057 se generó por PCR utilizando como oligonucleótidos CG1316 y AP2 primer (Clontech) a partir de la segunda ronda de *Genome-Walker* de la librería genómica de *S. aurata*. El fragmento va ser purificado y ligado al vector pGEM-T *Easy*.

pGEM-ARNmGDH2715: El constructo pGEM-ARNmGDH2715 se generó por PCR utilizando como oligonucleótidos CG1333 y CG1334 a partir del ADNc de hígado de *S. aurata*. El fragmento va ser purificado y ligado al vector pGEM-T *Easy*.

TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR es utilizada para amplificar fragmentos de ADN a partir de un ADN molde (Saiki *et al.*, 1988). La zona a amplificar queda delimitada por dos oligonucleótidos (*sense* y *antisense*) que son complementarios a una secuencia conocida. Estos oligonucleótidos funcionan como un cebador para la síntesis de ADN por la ADN polimerasa. La enzima que realiza la síntesis de ADN es una ADN polimerasa termoestable. En esta tesis se han utilizado las polimerasas: *Taq* polimerasa (Biotools) y *Expand High Fidelity* (Roche), utilizada cuando se requiere una mejor fidelidad en la amplificación (clonaje).

Las secuencias de los cebadores utilizados dependen de las regiones del ADN que se requieren amplificar. De manera general los cebadores deben ser homólogos a la región que hibridan, estar compuestos entre 18 y 25 nucleótidos, presentar un mínimo de 50% de residuos de G y C y no formar dímeros o estructuras secundarias. Existen diversos programas informáticos que ayudan al diseño de cebadores para PCR y para el cálculo de temperatura óptimas de hibridación. Por ejemplo: *Oligo Explorer 1.2* (Gene Link, 2004).

En el proceso de amplificación del ADN, que se ha realizado en el termociclador, inicia con la desnaturalización del ADN molde a 95°C. Seguidamente se baja la temperatura a 72 °C para favorecer la hibridación de los cebadores. Los productos formados después de un ciclo completo, funcionan como molde para las sucesivas reacciones. Al final, se obtendrán por cada molécula bicatenaria de ADN molde 2ⁿ moléculas, siendo **n** el número de ciclos realizados.

Condiciones de PCR

Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos
Desnaturalización	94 °C	30 segundos
Hibridación ¹	50-65 °C	30 segundos
Extensión ²	72 °C	1 minuto
Extensión final	72 °C	5 minutos

¹ La temperatura de hibridación depende de los oligonucleótidos utilizados (tamaño, contenido de G/C, homología a la cadena molde).

² El tiempo de extensión varía en función de la longitud de los fragmentos a amplificar; se requiere aproximadamente 1 min/Kb en el caso de la *Taq* pol.

3.5 PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Para alinear y purificar fragmentos de ADN a partir de productos de PCR o de modificaciones enzimáticas (restricción enzimática, fosforilación) y para recuperar el ADN a partir de geles de agarosa, se ha utilizado el *Kit High Pure PCR Cleanup Micro Kit* (Roche). El procedimiento está basado en la unión selectiva del ADN, en presencia de tiocinato de guanidina a unas fibras de sílice empaquetadas en una columna. El ADN retenido a la columna es purificado por una serie de lavados que eliminan las sales, oligonucleótidos, cadenas de ADN inferiores a 100pb, nucleótidos no incorporados y enzimas. Posteriormente el ADN purificado es eluído con un tampón con concentración baja de sales.

Para conocer la concentración de ácidos nucleicos de una solución, se ha usado el espectrómetro *NanoDrop ND1000*, que permite efectuar determinaciones espectrofotométricas en microgotas. Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) absorben una longitud de onda de 260 nm, mientras que las proteínas a 280 nm. La pureza de los ácidos nucleicos es calculada en base a la relación A_{260}/A_{280} . Un factor entre 1.7-2 indica que la muestra está libre de proteínas. Para determinar la concentración de ADN o ARN se aplica la siguiente formula:

Concentración de ADN en ng/ μ L: $A_{260} \times 50$

Concentración de ARN en ng/ μ L: $A_{260} \times 40$

3.6 ELECTROFORESIS DE ADN

La técnica de electroforesis en gel horizontal de agarosa se emplea para separar macromoléculas en función, principalmente, del tamaño y la carga eléctrica. Tal separación tiene lugar por aplicación de una corriente eléctrica que recorre el soporte, en este caso, un gel de agarosa, en cuyo interior se encuentran las muestras. El ADN, por la existencia de grupos fosfato ionizados cargados negativamente, migrará hacia el polo positivo. Las bandas generadas como resultado de la amplificación por PCR se visualizan gracias a la tinción del gel con el agente intercalante *Redsafe* (Intron Biotechnology), sustancia fluorófora que tiene afinidad por el ADN.

La concentración de agarosa del gel determina la resolución de los fragmentos de ADN a separar. Los geles de agarosa al 1% (p/v) se utilizan para separar fragmentos de ADN de 0.4 a 6 Kb. Para fragmentos más pequeños se han utilizado geles al 2% de agarosa. La movilidad de los fragmentos de ADN es inversamente proporcional a su tamaño. Para referencia del tamaño del ADN, se utiliza un marcador de peso molecular 1 Kb *ladder* (Biotools), que incluye fragmentos de ADN de 250 a 10000 pb.

El tampón de carga de las muestras contiene glicerol que da densidad a las muestras y facilita la carga a los pocillos del gel, y *orange G* que permite la visualización del proceso de electroforesis.

PROTOCOLO:

Preparación del gel de agarosa

- 1.- Pesar la cantidad de agarosa deseada.
- 2.- Disolver la agarosa en TAE 1X calentado al microondas.
- 3.- Agregar el *RedSafe* (5 µl/gel).
- 4.- Armar la bandeja de porta geles y colocar los peines para formar los pocillos.
- 5.- Verter la agarosa en la bandeja y dejar solidificar el gel.

SOLUCIONES:

Tampón de electroforesis de ADN: TAE 1X*

Tris-HCl	4 mM
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	2 mM
Ácido acético glacial	20 mM

*Ajustar el pH a 8 y autoclavar

Solución de carga de muestras de ADN (6X)

Glicerol	30 %
<i>Orange G</i>	0,25 %

3.7 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE ADN

Para efectuar las digestiones enzimáticas, cada enzima requiere unas condiciones de fuerza iónica y temperaturas específicas. Es recomendable la utilización de 1 U de enzima por 1 µg de ADN, incubado durante 1 hora a la temperatura optima que corresponda a cada enzima, siguiendo las instrucciones de las casas comerciales y utilizando los tampones provistos.

3.8 CONVERSIÓN DE EXTREMOS DE ADN PROTUBERANTES EN ROMOS

La formación de extremos romos a partir de un fragmento de ADN con extremos protuberantes 5' o 3' es quizás un prerequisite antes de proceder a la ligación. La reacción de *fill-in* es realizada para generar extremos romos a partir de fragmentos de ADN resultantes de digestiones con enzimas de restricción que generen extremos protuberantes en 5', mientras que el *chew-back* seguido de *fill-in* es para los fragmentos de ADN que presentan extremos protuberantes 3'. La ADN polimerasa *Klenow* va a catalizar ambas reacciones (*chew-back* y *fill-in*). La subunidad *Klenow* de la DNA polimerasa presenta actividad exonucleasa 3' a 5', que es necesaria para realizar la reacción *chew-back*, y una actividad polimerasa 5' a 3' que cataliza la reacción *fill-in*.

Fill-in:

Preparar en un tubo los componentes de la reacción:

ADN		1 µg
Tampón <i>Klenow</i>	10 X	4 µL
dNTPs	10 mM	0,5 µL
ADN polimerasa <i>Klenow</i> (Roche)	2 U/µL	5 µL
H ₂ O mQ c.s.p.		40 µL

- 1.- Incubar a 37 °C durante 15 minutos.
- 2.- Inactivar la enzima a 75 °C durante 10 minutos.
- 3.- Purificar el ADN (ver apartado 3.5).

Chew-Back y Fill-in

Preparar en un tubo los componentes de la reacción:

ADN		1 µg
Tampón <i>Klenow</i>	10 X	4 µL
ADN polimerasa <i>Klenow</i> (Roche)	2 U/µL	5 µL
H ₂ O mQ c.s.p.		40 µL

- 1.- Incubar 1 hora a 37°C.
- 2.- *Fill-in*: Agregar 0.5 µL de dNTPs a 10 mM a la mezcla.
- 3.- Incubar 15 minutos a 37°C.
- 4.- Inactivar la enzima a 75°C durante 10 minutos.
- 5.- Purificar el ADN (ver apartado 3.5).

3.9 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Consiste en la unión de fragmentos de ADN mediante una reacción enzimática. La enzima que se utiliza en la reacción es la ADN ligasa del bacteriófago T4, que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre el fosfato 5' terminal y el hidroxilo terminal del extremo 3' del ADN, en presencia de ATP y Mg^{2+} .

PROTOCOLO:

Mezclar en un tubo:

T4 ADN ligasa (Promega)	3 U/ μ L	1 μ L
<i>Rapid Ligation Buffer</i>	2 X	5 μ L
Fragmentos de ADN a ser ligado (inserto y vector) ¹		4 μ L

¹ Rutinariamente se ha utilizado una relación molar 1:3 de vector respecto al inserto.

- 1.- Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- 2.- Dejar a 4°C durante toda la noche.

3.10 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

La transformación es una técnica que nos permite introducir ADN exógeno circular en células procariotas. Previamente se han de hacer competentes las células procariotas.

3.10.1 Obtención de células *E. coli* competentes

En condiciones normales la eficiencia de transformación de la *E. coli* es muy baja, ya que esta bacteria acepta la entrada de muy poco ADN exógeno. Por este motivo, antes de realizar la transformación, las células bacterianas son sometidas a un tratamiento para incrementar la permeabilidad de la membrana, convirtiéndolas así en células competentes, susceptibles de ser transformadas con más eficacia. Se utilizó el procedimiento descrito por (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 2001).

La cepa de *E. coli* utilizada en este trabajo fue:

E. coli DH5 α : *sup E44, AlacU169 (90 lac ZDN15), hsd R17, rec A1, gyr A96, thi-1, rel A1.*

PROTOCOLO:

- 1.- Inocular 3 mL de medio LB sin antibiótico con células *E. coli* y mantener en agitación constante a 37 °C durante 12-15 horas.
- 2.- Utilizar 0.5 mL del cultivo inoculado y volver a inocular a 50 mL de medio LB estéril.
- 3.- Dejar las células a 37 °C, en agitación, hasta que la $DO_{590\text{ nm}}$ llegue a 0.7-0.8, la cual indica que el cultivo se encuentre en fase exponencial.

- 4.- Sedimentar las células por centrifugación a 2500 g durante 10 minutos.
- 5.- Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 50 mL de $MgCl_2$ 100mM frío.
- 6.- Sedimentar las células por centrifugación a 2500 g durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 10 mL de $MgCl_2$ 100 mM frío.
- 7.- Agregar 100 mL de $CaCl_2$ 100 mM y mantener las células en hielo durante 60-90 minutos.
- 8.- Sedimentar las células mediante centrifugación a 2500 g durante 10 minutos.
- 9.- Retirar el sobrenadante y resuspender las células en 12.5 mL de la solución de resuspención.
- 10.- Hacer alícuotas de 200 μ l de células y congelar las inmediatamente a $-80^\circ C$.

SOLUCIONES:

Medio Luria Bertani (LB)

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L

Ajustar el pH a 7 y autoclavar.

Solución de resuspención:

$CaCl_2$	85 mM
Glicerol	15 %

Autoclavar.

3.10.2 Transformación por *shock* térmico

La transformación produce una alteración transitoria de la permeabilidad de la membrana de la células competentes, para facilitar la entrada del ADN. Las transformaciones en este trabajo se han efectuado por el método de shock termico, que facilita la entrada del ADN dentro de las células al disminuir el potencial de membrana (Panja y col., 2006).

PROTOCOLO:

- 1.- Descongelar en hielo ($0-4^\circ C$) una alícuota de células competentes.
- 2.- Agregar el ADN plasmídico a las células competentes, y dejar 15 minutos en hielo.
- 3.- Incubar 3 minutos a $42^\circ C$ (*shock* térmico) y luego dejar reposar 5 minutos en hielo.
- 4.- Agregar 800 μ l de medio LB estéril e incubar 45 minutos a $37^\circ C$.
- 5.- Sedimentar las células por centrifugación a 10000 g durante 30 segundos.
- 6.- Sembrar en placas de LB-agar con antibiótico de selección adecuada según el gen de resistencia del plásmido e incubar en una estufa a $37^\circ C$ durante 12-15 horas.

SOLUCIONES:

Medio LB:

Es preparado según las pautas del apartado 3.10.1

Placas de LB agar:

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar bacteriológico	20 g/L

Autoclavar

3.11 OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Para obtener ADN plasmídico libre de ADN genómico, proteínas y restos celulares, se han empleado los kits comerciales *GenElute Plasmid Miniprep Kit* y *GenElute Plasmid Midiprep Kit* (Sigma). Se deja crecer un cultivo recombinante de *E. coli* durante toda la noche en medio LB con el antibiótico adecuado. Se recogen las células por centrifugación y se someten a lisis alcalina para liberar el contenido celular. Se sedimentan por centrifugación los restos celulares, proteínas, lípidos, SDS y ADN cromosómico. El ADN plasmídico se une a una columna de sílica en presencia de altas concentraciones de sales. Los contaminantes se eliminan con lavados posteriores, y finalmente el ADN plasmídico es eluido con una solución baja en concentración de sales.

3.12 SECUENCIACIÓN DEL ADN

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en el laboratorio de Genómica de los servicios científicos técnicos de la Universidad de Barcelona (CCiT-UB).

PROTOCOLO:

Mezclar ADN y cebadores en las cantidades correctas en el tubo de PCR.

Cantidad de ADN	100 ng por 1 Kb de ADN molde
Cantidad de cebadores	3,2 pmols-5 pmols
Temperatura de hibridación óptima	50 °C (cebadores específicos) o 37 °C (cebadores de plásmidos comerciales)

- 1.- Rotular de manera clara y sencilla en los tubos de PCR.
- 2.- Dejar los tubos abiertos y secar el ADN y el cebador en un termociclador a 80 °C durante 10-15 minutos o hasta la total evaporación de la muestra.
- 3.- Tapar las muestras disecadas y guardarlas a 4 °C o 20 °C hasta remitir la muestra al CCiT-UB.

3.13 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para el diseño de oligonucleótidos se ha utilizado el programa informático *Oligo Explorer*. Para alinear secuencias de ADN y proteína se han utilizado los programas informáticos *Clustal W* (alineamiento múltiple de secuencias de ADN y proteína) y *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool), un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o proteína, capaz de comparar una secuencia contra una cantidad de secuencias que se encuentra en una base de datos. Además, se ha utilizado el programa *RestrictionMapper* para la generación de mapas de restricción de secuencias de ADN, *JASPAR* para el análisis de las regiones reguladoras en las secuencias del genoma y la detección de potenciales sitios de unión para factores de transcripción, y *CLC Main Workbench*, un paquete de *software* integrado que permite realizar análisis avanzados de secuencias de ADN, ARN y proteínas, combinados con análisis de expresión génica, gestión de datos con la base de NCBI y opciones gráficas de visualización.

3.14 PCR COLONIA

El PCR colonia nos permite analizar, mediante PCR, el ADN de las colonias obtenidas en la transformación. En este PCR, se utiliza como molde las colonias obtenidas en la transformación utilizando oligonucleótidos del vector que flanquean el lugar de inserción del fragmento clonado. Así, podremos discernir las colonias que han incorporado el plásmido recombinante y determinar el tamaño del fragmento clonado por electroforesis en gel de agarosa (apartado 3.6). En aquellas colonias que mediante la reacción de PCR es detectada la incorporación del inserto (del tamaño esperado), se confirma la presencia mediante restricción enzimática y posterior secuenciación. Para realizar este análisis se deberá aislar previamente el ADN plásmidico de las colonias positivas (apartado 3.11).

3.15 PASEO CROMOSÓMICO (“*Genome Walker*”)

Para realizar el paseo cromosómico se ha utilizado el kit *Universal GenomeWalker* (Clontech). Este sistema permite encontrar secuencias de ADN genómico desconocidas adyacentes a una secuencia conocida.

Para encontrar el ADN genómico de interés, el primer paso fue construir cuatro librerías de ADN, posteriormente se digirieron cuatro alícuotas de DNA genómico con enzimas de restricción que dejan extremos romos (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*). A los fragmentos resultantes de estas cuatro librerías se le liga un adaptador *GenomeWalker*, que contiene una secuencia que permite la hibridación de los cebadores suministrados por el kit (AP1 y AP2). Una vez construidas las librerías y ligadas los adaptadores, se realizaron para cada librería dos amplificaciones mediante la técnica de PCR. En la primera amplificación (PCR primario) utilizamos el *outer adaptor primer* AP1, y un cebador específico del gen de interés diseñado por nosotros. En la PCR secundaria utilizamos el *nested adaptor primer* (AP2) y un cebador más interno a la utilización a la PCR primaria y específico del gen de interés.

3.15.1 Construcción de las librerías *Genome Walker*

PROTOCOLO:

- 1.- Rotular 5 tubos: DL1, DL2, DL3, DL4 y un control positivo
- 2.- Mesclar para cada reacción, por separado los siguientes reactivos:

ADN genómico	0,1 µg/µL	25 µL
Enzima de restricción (<i>DraI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>PvuII</i> o <i>StuI</i>)	10 UµL	25 µL
Tampón de la enzima de restricción (10X)	10 X	10 µL
Agua mQ c.s.p.		100 µL

- 3.- Incubar a 37°C durante 2 horas.
- 4.- Agitar suave durante 5-10 segundos. Incubar a 37°C 16-18 horas.
- 5.- Comprobar que la digestión está completa mediante electroforesis (apartado 3.6).

3.15.2 Purificación del DNA

PROTOCOLO:

- 1.- A cada tubo agregar 1 volumen de fenol.
- 2.- Homogeneizar a baja velocidad 5-10 segundo y centrifugar para separar la fase acuosa y orgánica.
- 3.- Transferir la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo. Descartar la fase orgánica.
- 4.- A cada tubo agregar 2 volúmenes de etanol 95% frío, 1/10 volumen de NaOAc 3M pH 4.5 y 20 µg de glicogen.
- 5.- Homogeneizar a baja velocidad 5 – 10 segundos y Centrifugar a 15.000 rpm 10 minutos
- 6.- Resuspender el sedimento con 100 µL de etanol frío.
- 7.- Centrifugar a 15000 rpm 5 minutos y Retirar el sobrenadante y dejar secar el sedimento al aire. Disolver el precipitado en 20 µL de TE pH 8.

3.15.3 Ligación del ADN genómico a los adaptadores *Genome Walker*

PROTOCOLO:

1.- Incubar los componente de la reacción durante toda la noche a 16 °C.

ADN purificado y digerido	200 ng	4 µL
Adaptador <i>Genome Walker</i>	25 µM	1.9 µL
Tampón de ligasa	10 X	1.6 µL
T4 ADN ligasa (Promega)	6 U/µL	0.5 µL
H ₂ O mQ c.s.p.		16µL

2.- Parar la reacción incubando a 70 °C durante 5 minutos.

3.- Resuspender cada tubo con 72 µL de TE 1X

3.15.4 PCR

El protocolo del kit *Genome Walker* consiste en una amplificación por PCR primaria y secundaria utilizando cada una de las cuatro librerías experimentales obtenidas. Para este fin, se usaron el oligonucleótido AP1 (provisto por el kit) y el CG1315 (oligonucleótido específico), para la PCR primaria, y el oligonucleótido AP2 (provisto por el kit) y el CG1316 (oligonucleótido específico) para la PCR secundaria.

PROTOCOLO:

PCR PRIMARIA:

1.- Preparar la siguiente mezcla de reacción para cada una de las librerías.

<i>Advantage 2 PCR Buffer</i>	10 X	5 µL
dNTPs	10 mM	1 µL
AP1	10 µM	1 µL
Oligonucleótido específico de gen A	10 µM	1 µL
Librería <i>GenomeWalker</i>	200 ng	1 µL
<i>Advantage Genomic Polymerase Mix</i>	50 X	1 µL
Agua mQ c.s.p.		50 µL

Condiciones de PCR

7 ciclo	94 °C	25 segundos
	72 °C	3 minutos
32 ciclos	94 °C	25 segundos
	67 °C	3 minutos
1 ciclo	67 °C	7 minutos

Una vez finalizada la PCR, se analiza 8 µL del producto en un gel de agarosa al 1%.

PCR SECUNDARIA:

2.- Preparar en un tubo la siguiente mezcla:

<i>Advantage 2 PCR Buffer</i>	10 X	5 µL
dNTPs	10 mM	1 µL
AP2	10 µM	1 µL
Oligonucleótido específico del gen	10 µM	1 µL
Producto de PCR primario	200 ng	1 µL
<i>Advantage Genomic Polymerase Mix</i>	50 X	1 µL
Agua mQ c.s.p.		50 µL

Condiciones de PCR

5 ciclos	94 °C	25 segundos
	72 °C	3 minutos
20 ciclos	94 °C	25 segundos
	67 °C	3 minutos
1 ciclo	67 °C	7 minutos

Se analiza 5µL del producto de PCR secundario en un gel al 1%.

3.16 AMPLIFICACIÓN DE EXTREMOS DE ADNc POR RACE: RLM-RACE

La técnica de amplificación rápida de extremos de ADNc, conocida como RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) y descrita por primera vez por Frohman y col (1988), permite la clonación y análisis de extremos 5´ y 3´ de un determinado ADNc a partir de una secuencia parcial de ADNc conocida. Para los experimentos de RACE-PCR-5´y 3´ descritos en este trabajo, se ha utilizado el *Kit FirstChoice* RLM-RACE Kit de Ambion.

3.16.1 Amplificación rápida de los extremos 5´ del ADNc

La técnica de RACE 5´ (*Rapid Amplification of 5´ cDNA Ends*) proporciona una metodología óptima para obtener extremos 5´ completos de un ADNc concreto, utilizando para ello secuencias conocidas. El kit se basa en las técnicas *ARN ligase-mediated* RACE (RLM-RACE) y la *Oligo-capping Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE), que da como resultado la ligación selectiva de un oligonucleótido de ARN al extremo 5´ de un ARNm concreto sin estructura *cap*. Gracias a la eliminación de ARNms truncados durante el proceso de amplificación, se asegura la amplificación de transcritos completos.

El ARN total o poli(A) es tratado con *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIP) para eliminar el fosfato 5´ de las moléculas tales como ARN ribosomal, ARN mensajero y de transferencia fragmentados y ADN genómico contaminante. La fosfatasa no afecta a la

estructura *cap* del extremo 5' de los ARNm. El ARN es tratado luego con *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP) para eliminar la estructura *cap* del ARNm íntegro, exponiendo un 5'-monofosfato. Posteriormente, ligamos a los ARN tratados un adaptador de 45 oligonucleótidos proporcionado por el kit usando T4 ARN ligasa. El ARN adaptador no se liga a los ARN desfosforilados porque estas moléculas carecen del 5'-fosfato necesario para la ligación. Durante la reacción de la ligación la mayoría de los ARN que contienen 5'-monofosfato adquieren la secuencia del adaptador como su 5' terminal. La reacción de retrotranscripción genera una copia completa de ADNc del ARN original con la secuencia del adaptador 5' terminal. El ADNc resultante es utilizado para las siguientes reacciones de PCR.

3.16.2 Amplificación rápida de los extremos 3' del ADNc

Para amplificar la secuencia 3' terminal de ARN mensajeros se ha usado la técnica 3'-RACE. Primero el ADNc es sintetizado a partir de ARN total o ARN poli(A) usando un adaptador 3'-RACE terminal. El ADNc es luego utilizado para los PCR usando oligonucleótidos 3'-RACE, los cuales son complementarias al adaptador 3'-RACE terminal.

3.16.3 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos para amplificar extremos de ADNc mediante la técnica de RLM-RACE han de tener una longitud comprendida de 23 a 28 nucleótidos, un 50-70% de GC, y la temperatura de *melting* (T_m) ha de ser de al menos 65°C. Un T_m más de 70°C genera resultados más satisfactorios y permite realizar un *touchdown* PCR.

3.16.4 Amplificación primaria para el RACE 5' y 3'

PROTOCOLO:

- 1.- Las reacciones de RACE 5' y 3' utilizan la misma mezcla de reacción.

Mezcla de PCR (<i>Master Mix</i>)	
<i>Super Taq-Plus Buffer</i> (10X)	5 µL
dNTP <i>mix</i> (10 mM)	1 µL
<i>Super Taq-Plus Polymerase</i>	1 µL
H ₂ O mQ c.s.p.	50 µL

- 2.- Agregar a la mezcla de PCR:

RACE 5'		RACE 3'	
5'-RACE <i>outer Primer</i>	2,5 µL	3'-RACE <i>outer Primer</i>	2,5 µL
Oligonucleótido específico	1 µM	Oligonucleótido específico	1 µM
ADNc de pasos anteriores	1 µL	ADNc de pasos anteriores	1 µL

3.- La amplificación primaria es realizada mediante *touchdown*-PCR.

5 ciclo	94 °C	1:30 minutos
	72 °C	1 minuto
	94 °C	30 segundos
5 ciclos	70 °C	30 segundos
	72 °C	1 minuto
	94 °C	1 minuto
20 ciclos	67 °C	30 segundos
	72 °C	1 minuto

3.16.5 Amplificación secundaria para el RACE 5' y 3'

Para llevar a cabo un incremento de la especificidad del producto de PCR, se realiza una amplificación secundaria, mediante el oligo 5'-RACE *inner Primer* y un oligonucleótido específico del gen estudiado.

PROTOCOLO:

- 1.- El producto de PCR primario es diluido en 245 µL de tampón TE.
- 2.- Preparar la mezcla de reacción:

RACE 5'		RACE 3'	
5'-RACE <i>inner Primer</i>	2,5 µL	3'-RACE <i>inner Primer</i>	2,5 µL
Oligo específico (10 µM)	1 µL	Oligo específico (10 µM)	1 µL
<i>Super Taq-Plus Buffer</i> 10X	5 µL	<i>Super Taq-Plus Buffer</i> (10X)	5 µL
<i>Super Taq-Plus Polymerase</i>	1 µL	<i>Super Taq-Plus Polymerase</i>	1 µL
dNTP <i>mix</i> (10 mM)	1 µL	dNTP <i>mix</i> (10 mM)	1 µL
Dilución del PCR primario	1 µL	ADNc de pasos anteriores	1 µL
H ₂ O mQ c.s.p.	50 µL	H ₂ O mQ c.s.p.	50 µL

Los productos de PCR se analizaron en un gel al 1%. Para determinar el origen de transcripción, los fragmentos obtenidos son clonados en el vector pGEM-T *Easy* y es secuenciado posteriormente.

Condiciones de PCR

94 °C	30 segundos
68 °C	30 segundos
72 °C	3 minutos
35 ciclos	(paso 1 - 3)

3.17 TRANSCRIPCIÓN INVERSA

La transcriptasa inversa (RT), es una polimerasa de ADN producida por retrovirus. Sintetiza una cadena sencilla de ADN complementaria (ADNc) a partir de ARN molde. La transcripción inversa requiere una polimerasa ARN dependiente (RT), ARN molde, dNTPs y cebadores, que pueden ser hexámeros aleatorios. Para prevenir la degradación del ARN, se incluye inhibidores de ARNsas (RNAsin, Promega). La reacción se realiza a 37 °C, durante 60 minutos.

PROTOCOLO:

1.- Mezcla de reacción:

<i>First Strand buffer</i>	5 X	4 µL
dNTPs	10 mM	2 µL
Hexámeros aleatorios (Invitrogen)	62.5 ng/µL	2 µL
Inhibidor de ARNsas (Invitrogen)	80 U/µL	0.5 µL
ARN total		1 a 5 µg
MMLV-RT ¹ (Invitrogen)	200 U/µL	1 µL
Agua mQ c.s.p.		20 µL

¹MMLV-RT: *Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*.

3.18 RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-PCR)

La RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) permite determinar la cantidad de ARNm en una muestra. El proceso completo incluye el alineamiento del ARN, la retrotranscripción a ADNc y a la amplificación del ADNc mediante la PCR. El sistema de RT-qPCR está basado en la detección y cuantificación de un marcador fluorescente (Lee, 2004; Livac y Schmittgen 2001). Esta señal incrementa de manera proporcional a la cantidad de producto de PCR presente en la reacción. Para la monitorización de la amplificación del ADN se utilizó como agente intercalante *SYBR Green*. El *SYBR Green* es un fluoróforo que se une a todas las cadenas dobles de ADN (Morrison, Weis and Wittwer, 1998).

PROTOCOL:

1.- Mezclar en un tubo estéril:

ADNc diluido 1:10 en agua		3.2 µL
Oligonucleótido sentido	10 µM	1.6 µL
Oligonucleótido antisentido	10 µM	1.6 µL
<i>SYBR Green</i> PCR Master Mix	2 X	20 µL
Agua libre de ADNsas c.s.p.		40 µL

Condiciones de PCR

95 °C	10 minutos
95 °C	15 segundos
62 °C	1 minuto

40 ciclos del paso 2 al 3.

El ADNc de cada muestra fue amplificado por duplicado, para la cual en cada tubo se depositaron 18 μ l de la mezcla de la reacción. El equipo utilizado fue *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Como genes reporteros se han utilizado los genes β -actina, *elongation factor 1-alpha* (EF-1 α) y la subunidad ribosomal 18s. El método utilizado para determinar la cantidad relativa de los genes de interés es el Método Comparativo de Ct (*Comparative threshold (Ct) method* ($\Delta\Delta Ct$)).

Una vez finalizada la PCR, se obtiene una curva donde se representa la fluorescencia obtenida respecto al ciclo de PCR. De aquí se obtendrá el valor de Ct (ciclo límite o *cycle threshold*) que es el ciclo en que se detecta un incremento significativo de ΔRn (magnitud de la señal de fluorescencia generada durante la PCR en cada punto) por primera vez. Así, a mayor cantidad de ADNc de partida, el producto de PCR acumulado es detectado antes. Y menor es el valor de Ct. La fluorescencia obtenida es normalizada automáticamente dividiendo la intensidad de emisión del marcaje del reportero por la intensidad de emisión de la referencia pasiva. Como referencia pasiva utilizamos el ROX (6-carboxi-X-rodamina), presente en la mezcla de SYBR Green, que proporciona una referencia interna por la emisión de fluorescencia de fondo, usada para normalizar la señal de SYBR Green. Esta normalización es para las fluctuaciones de fluorescencia no relacionadas con la PCR que pueden tener lugar en los diferentes pocillos (diferencia en volumen o concentración, burbujas) o en el tiempo.

Una vez determinada el valor Ct, se ha de calcular el ΔCt .

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen diana}) - Ct(\text{gen reportero o la media geométrica de genes reporteros})$$

Este valor es cuantificado para cada muestra a cuantificar.

Posteriormente, una de las muestras se escoge como valor de referencia para efectuar la comparación con el resto, obteniendo así el valor $\Delta\Delta Ct$.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{muestra X}) - \Delta Ct(\text{muestra de referencia})$$

El último paso es transformar los datos a valores absolutos:

$$\text{Valor de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Siempre que se haya de realizar una RT-qPCR con oligonucleótidos que no se han empleado anteriormente, se ha de determinar la curva de disociación de los cebadores y la curva de concentración, a fin de comprender la especificidad de los oligonucleótidos.

3.18.1 Curva de disociación de oligonucleótidos

Este paso es importante realizar cuando se trabaja con *SYBR Green*, ya que, al intercalarse en la cadena de doble hebra de ADN de forma inespecífica, se podría detectar productos de PCR no específicos o la dimerización de los oligonucleótidos utilizados. El procedimiento está basado en detectar la fluorescencia emitida por cada pocillo a diferentes temperaturas. Idealmente, las muestras deben de dar lugar a un único pico definido a la temperatura de fusión del amplicón, mientras que en los pocillos donde no se ha añadido ADNc (control negativo de amplificación, hechos con agua) no deben generar una señal fluorescente significativa. Para verificar que el RT-qPCR ha dado lugar a la amplificación de una única banda y del tamaño adecuado, se hace una electroforesis del producto de PCR y su control negativo.

3.18.2 Curva de concentración

Nos permite saber el rango de concentración inicial de la muestra con que tendremos unos resultados de Ct adecuados. Se determina haciendo varias diluciones del ADNc de prueba. Se representan los valores logarítmicos de la dilución respecto a los valores de Ct obtenidos. Habrá de generar una recta tanto para el gen normalizador como para el gen en estudio.

3.19 WESTERN BLOT

La técnica de *Western blot* se utiliza para detectar proteínas utilizando un anticuerpo específico. Las proteínas han sido sometidas previamente a una resolución electroforética en geles de poliacrilamida con SDS, y a la transferencia a una membrana de nitrocelulosa.

3.19.1 Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) es una técnica utilizada para la separación de proteínas en función de su peso molecular. Consiste

en la desnaturalización de las proteínas de la muestra con SDS, que confiere carga negativa al complejo proteico. Las proteínas desnaturalizadas se separan en una matriz de poliacrilamida sometida a un campo eléctrico. La electroforesis se va realizar según las indicaciones de Laemmli (Laemmli, 1970).

3.19.1.1 Preparación de las muestras

Una vez obtenida y cuantificada la proteína de los extractos (apartado 3.21), se les añade el tampón de carga de proteínas y se dejar hervir durante 5 – 10 minutos. La ebullición en presencia de SDS y β -mercaptoetanol permite que las proteínas se desnaturalicen.

SOLUCION:

Tampón de carga de proteína 4 X

Tris-HCl pH 6,8	0,25 M
SDS	8 %
Glicerol	40 %
B-mercaptoetanol	20 %
Azul de bromofenol	0,04%

3.19.1.2 Preparación de geles de poliacrilamida

Para efectuar los SDS-PAGE se utilizan geles que consta de dos partes: gel apilador y gel separador. Estos se diferencian por la concentración de poliacrilamida y el pH. La parte superior, formada por el gel apilador, contiene una proporción de acrilamida del 4%, de manera que la medida de los poros del gel es mayor. La función de este gel es alinear la entrada de las proteínas antes de ser separadas. La alineación de las proteínas se da en la interfase entre el gel separador y apilador debido a la diferencia de pH entre ellas.

La parte inferior del gel está constituida por el gel separador, con un porcentaje mayor de poliacrilamida (7 – 20%) que genera un tamaño de poros más pequeños, lo que a su vez permite la separación de las proteínas en función del tamaño molecular. Concentraciones elevadas de polímero mejoran la resolución de las muestras con un bajo peso molecular, mientras que geles separadores con concentraciones bajas de polímero favorecen la transferencia a membrana. Estos geles se han preparado utilizando vidrio y cubetas *OWL*.

SOLUCIONES:

Gel separador (10% acrilamida pH 8,8)		Gel apilador (4% acrilamida pH 6,8)	
Acrilamida/bisacrilamida	3,3 mL	Acrilamida/bisacrilamida	3,3 mL
Tampón B	2,5 mL	Tampón A	2,5 mL
SDS 10%	100 µL	SDS 10%	100 µL
H ₂ O	4 mL	H ₂ O	4 mL
Persulfato de amonio 10%*	75 µL	Persulfato de amonio 10%*	75 µL
TEMED*	7,5 µL	TEMED*	7,5 µL

*El persulfato de amonio actúa como un polimerizador de la acrilamida/bisacrilamida, mientras que el TEMED cataliza la polimerización. Se ha de agregar al final de la mezcla.

Tampón A:

Tris HCl 0,5 M pH 6,8

Tampón B:

Tris HCl 1,5 M pH 8,8

Acrilamida/bisacrilamida:

30% *acrilamida/Bis solution*, 37,5:1 (2,6 % C) (BioRad)

3.19.1.3 Proceso de electroforesis

Para identificar los pesos moleculares de las proteínas de las muestras en estudio, se carga en un carril marcadores preteñidos de peso molecular conocido, *Kaleidoscope Prestained Standards* (BioRad). Las muestras, con igual cantidad de proteína, se cargan al gel para llevar a cabo la electroforesis a temperatura ambiente. En caso de utilizar geles de 0.75 mm de grosor, el proceso de electroforesis es realizado a 15 mA durante la migración de las proteínas en el gel apilador y a 20 mA cuando entran en el gel separador. De manera general, el proceso acaba cuando el colorante azul de carga llega a la parte inferior del gel. Una vez finalizada la electroforesis, se procede a la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa.

SOLUCIÓN:

Tampón de electroforesis

Tris-HCl pH 8,3	0,025 M
Glicina	0,192 M
SDS	0,1 %

3.19.2 Transferencia de proteína a membrana

Las proteínas son transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno PVDF (Amersham Hybond-P PVDF Membrane, UK) por electroelución a 90 V durante 2 horas a 4 °C, en tampón de transferencia.

PROTOCOLO:

- 1.- Se descarta el gel apilador. El gel separador se deposita sobre papel *Whatman* (Schleicher & Schuell, England), previamente humedecido con tampón de transferencia de proteínas, situado sobre una esponja sobre la tapa negra del *cassette* de transferencia (BioRAD).
- 2.- Sobre el gel se pone la membrana de PVDF previamente humedecida donde se van a transferir las proteínas, sobre esto se deposita un segundo papel *Whatman* y otra esponja. Es importante eliminar las burbujas de aire que puede haber entre la membrana y el gel.
- 3.- Cerrar el *cassette* e introducirla en la cubeta de transferencia (BioRad). Aplicar un voltaje de 90 V. Este proceso tiene lugar a 4 °C durante 2 horas.
- 4.- Una vez realizada la transferencia, las proteínas del gel pueden ser teñidas con el colorante *Coomasie blue* a fin de comprobar que el proceso de transferencia se ha realizado correctamente.

SOLUCIÓN:

Tampón de transferencia de proteínas

Tris-HCl pH 8,3	0,025 M
Glicina	0,192 M
Metanol	20 %

Se prepara en el momento de la transferencia

3.19.2.1 Visualización de las muestras en geles de poliacrilamida

El procedimiento de tinción se basa en la fijación del colorante azul de *coomassie* a las proteínas.

PROTOCOLO:

- 1.- Incubar el gel en solución de *coomassie* durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 2.- Lavar con la solución de lavado con el fin de eliminar la coloración inespecífica.

SOLUCIONES:

Solución de lavado

Metanol	40 %
Ácido acético glacial	7 %

Solución de tinción

Metanol	40 %
Ácido acético glacial	7 %
Azul de <i>Coomassie</i>	0,025.%

3.19.3 Bloqueo de la membrana

El proceso de bloqueo es realizado para reducir el ruido de fondo durante la inmunodetección. La membrana donde se encuentran las proteínas transferidas, se ponen en agitación con 100 mL de solución de bloqueo durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lava en tampón TBS-T durante 5 minutos.

SOLUCIONES:

Solución de bloqueo

Leche descremada en polvo	10 %
TBS	1 %

TBS 1X

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

3.19.4 Inmunodetección

Para efectuar la inmunodetección, se han seguido las pautas descritas por el proveedor del *kit ImmunStar HRP Substrate* (Bio-Rad). La técnica se basa en la incubación sucesiva de la membrana con dos anticuerpos. El anticuerpo primario es una inmunoglobulina G (Ig G) que reconoce la proteína de interés. El anticuerpo secundario es un anticuerpo anti-IgG, que reconoce al anticuerpo primario y lleva covalentemente unido una enzima peroxidasa. Esta enzima cataliza la oxidación del luminol en medio alcalino, originando la formación de quimioluminiscencia, que será captada a través del equipo *ImageQuant LAS 4000 mini* (GE Healthcare) y cuantificado usando el software *ImageJ* (BNational Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)

PROTOCOLO:

- 1.- Incubar la membrana con una dilución adecuada del anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en un agitador orbital

- 2.- Retirar el anticuerpo primario (la solución se conserva a -20 °C para ser utilizado en experimentos posteriores). Efectuar 3 lavados de la membrana durante 10 – 15 minutos con 100 mL de solución de lavado.
- 3.- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario durante 60 minutos en agitación suave y a temperatura ambiente.
- 4.- Retirar el anticuerpo secundario y lavar 3 veces como se describe en el punto 2.
- 5.- Preparar la solución de detección: se mezcla a partes iguales la solución *Luminol/Enhancer* y el tampón de la peroxidasa. Posteriormente la membrana es incubada en la solución de detección durante 5 minutos, a temperatura ambiente.
- 6.- Se retira el exceso de solución y se expone y revela durante un máximo de 45 minutos.

SOLUCIONES:

Solución de dilución de anticuerpos

Leche descremada en polvo	5 %
TBS	1X
Tween20*	0,1 %

Solución de lavado

TBS	1X %
Tween20*	0,1 %

*El Tween20 es un detergente que dificulta las interacciones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana, obteniendo así imágenes más nítidas y con menor número de bandas inespecíficas.

3.19.4.1 Anticuerpos utilizados

Anticuerpos primarios: Anti-GDH1 purificado a partir de conejo (OriGene TA338163).

Anti-actina purificado a partir de conejo (Sigma A2066).

Anticuerpo secundario: Anticuerpo IgG anti conejo purificado a partir de cabra (Cell Signaling Technology #7074).

3.20 ENSAYO DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA EN GEL (UNIÓN ADN-PROTEÍNA)

Técnica que permite estudiar la interacción ADN-proteína *in vivo*. Consiste en la incubación de proteínas (procedentes de los extractos nucleares) con un fragmento de ADN marcado en el extremo 3' con dideoxinucleótidos DIG (DIG-ddUTP). La unión de proteína-ADN genera un complejo de cambio de movilidad en relación al fragmento de ADN libre al someterse las muestras a electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante.

3.20.1 Obtención de extractos nucleares

Para esta finalidad se siguió el protocolo descrito por Andrews y Faller (1991).

PROTOCOLO:

- 1.- Cultivar las células eucariotas transfectadas con un plásmido que exprese la proteína de interés.
- 2.- Centrifugar durante 10 segundos y lavar el sedimento 2 veces con 1 mL de PBS.
- 3.- Resuspender en 400 μ l de tampón A frío e incubar en hielo durante 10 minutos.
- 4.- Agitar al vórtex durante 10 segundos, y centrifugar 10 segundos.
- 5.- Resuspender el sedimento (núcleos) 100 μ l de tampón C frío e incubar 20 minutos.
- 6.- Centrifugar durante 2 minutos a 13000 rpm, para separar los residuos celulares de las proteínas nucleares (sobrenadante).
- 7.- Cuantificar la proteína del sobrenadante. Alicuotar y almacenar a -80 °C.

SOLUCIONES:

Tampón A (Hypotonic Buffer)

Hepes-KOH Ph 7,9	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
KCl	10 mM
NaNO ₃	2 mM
NaF	2 mM

Tampón C (High Salt Buffer)

Hepes-KOH Ph 7,9	20 Mm
Glicerol	25 %
NaCl	420 mM

Antes de ser utilizados se agrega DTT 0,5 mM y PMSF 0,2 mM a los tampones A y C.

3.20.2 Preparación de oligonucleótidos marcados

Se utilizan fragmentos de ADN de doble cadena de un tamaño de 20 – 30 nucleótidos y un nucleótido extra 3' protuberante. Son marcados en el extremo 3' con una molécula de DIG-ddUTP mediante la acción de una transferasa terminal.

3.20.2.1 Obtención de oligonucleótidos de doble cadena

PROTOCOLO:

- 1.- Se mezclan 6 μ g de oligonucleótidos sentido y antisentido en un tubo en presencia de buffer M (Roche) en un volumen final de 14 μ l y hervir durante 5 minutos.
- 2.- Se calcula la concentración de ADN en pmol/ μ L, según la siguiente fórmula:

$$\frac{2 \times 10^6 \times \mu\text{g}/\mu\text{L (dsDNA)}}{N \text{ pb}^* \times 660 \text{ Da}}$$

*N pb: número de pares de bases de los oligonucleótidos de doble cadena.

3.20.2.2 Marcaje de fragmentos de ADN con DIG-ddUTP

Los oligonucleótidos de doble cadena empleados en el ensayo de cambio de movilidad electroforética fueron diseñados con un nucleótido extra en el extremo 3' para favorecer la actividad transferasa terminal. La enzima transferasa terminal cataliza la adición de nucleótido al extremo 3' del ADN. Esta enzima se utilizó para marcar los oligonucleótidos de doble cadena para la adición de digoxigenina en el extremo 3'.

PROTOCOLO:

- 1.- Incubar la reacción a 37 °C durante 30 minutos.

dsADN 3' protuberante		200 pmol
Tampón TdT (Roche)	5 X	4 µL
CoCl ₂	25 mM	4 µL
DIG ddUTP (Roche)	1 mM	1 µL
TdT (Roche)		1 µL
H ₂ O mQ c.s.p.		20 µL

- 2.- Parar la reacción agregando 2 µL de EDTA 0,2 M.
- 3.- Hacer alícuotas y guardar a -20 °C.

3.20.2.3 Dot Blot

Esta técnica permite comprobar que la sonda de doble cadena se ha marcado correctamente. Se hacen unas series de diluciones de la sonda purificada, que se depositan en una membrana de PVDF para realizar a continuación una inmunodetección.

PROTOCOLO:

- 1.- Se prepara diluciones de la sonda (1/4, 1/40, 1/400, 1/4000) en TE.
- 2.- Humedecemos la membrana de PVDF en solución SSC 2X.
- 3.- Depositamos 1 µL de cada dilución en la membrana de PVDF.
- 4.- Fijamos el ADN durante 3 minutos a luz ultravioleta o 2 horas a 80 °C.
- 5.- Una vez se ha fijado el ADN a la membrana se procede a realizar la inmunodetección.

3.20.3 Reacción de interacción proteína-ADN marcado

PROTOCOLO:

- 1.- Se mezclan los componentes de la reacción y se incuba 1 hora a 4 °C.

Extractos nucleares		10 µL
Oligonucleótidos marcados	9,1 pmol/µL	1 µL
Poli [d(I-C)]*	1 µg/µL	1 µL
Tampón de unión	5 X	5 µL
H ₂ O mQ c.s.p.		20 µL

SOLUCIONES:

SSC 20X

Citrato sodico	0,3 M
NaCl	3 M

Ajustar el pH 7, autoclavar.

Tampón de unión

Hepes pH 7,6	100 mM
EDTA	5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM
DTT	5 mM
Tween20	1 % (w/v)
KCl	150 mM

**Poli dl-Dc* (Roche): Es un competidor no específico de ADN que se emplea para minimizar la unión de proteínas no específicas a la sonda de ADN.

Como control se utilizó la sonda sin extracto proteico, con el fin de tener una referencia de movilidad de la sonda libre.

Los **ensayos de competición** nos indican la especificidad de la interacción entre los oligonucleótidos marcados y la proteína. Se realizan para detectar la interacción entre el ADN (fragmento del promotor marcado) y el factor de transcripción (proteína) en estudio. En este estudio los extractos nucleares fueron preincubados durante 30 minutos con un exceso de la sonda control no marcada a 4 °C. Posteriormente se agregó el oligonucleótido marcado durante 30 minutos más.

La reacción de unión se detiene añadiendo 5 µL de tampón de carga a la mezcla de reacción. Finalmente, la electroforesis se realiza en un gel de poliacrilamida al 5%, utilizando TBE 0,5X como tampón de electroforesis, a 20 mA, a 4 °C, durante 1 hora.

SOLUCIONES:

Tampón de carga:

Azul de bromofenol	0,04 %
TBE	0,25X
Glicerol	40 %

TBE 10X

Tris	980 mM
Ácido bórico	890 mM
EDTA	0,5 M

Gel poliacrilamida (6 %):

TBE 10X	1,8 mL
Acrilamida/bisacrilamida	3,6 mL
Persulfato de amonio 10 %	75 µL
TEMED	15 µL
H ₂ O mQ c.s.p.	18 mL

3.20.4 Transferencia y fijación a la membrana

Finalizado el proceso de electroforesis, el ADN es transferido por contacto (mínimo 1 hora a temperatura ambiente) a una membrana de PVDF.

PROTOCOLO:

- 1.- Se corta una membrana de PVDF y se deposita sobre el gel.
- 2.- Se cubre con 3 piezas de papel secante *Whatman* (Schleicher & Schuell) y otro vidrio.
- 3.- Sobre el montaje de filtro y membrana se coloca un peso de 1 Kg aproximadamente.
- 4.- Se realiza el contacto durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 5.- El ADN transferido se fija en las membranas por calor a 80 °C en un horno durante 2 horas o por entrecruzamiento, irradiando las membranas 3 minutos a luz ultravioleta.

3.20.5 Inmunodetección

La inmunodetección tiene como finalidad detectar en la membrana la sonda marcada con DIG-ddUTP que ha quedado unida específicamente al ADN. Para tal fin, se utilizó el anticuerpo antiDIG-AP conjugado con fosfatasa alcalina (Roche), y un sustrato de esta fosfatasa, CDP-StarTM (Roche).

PROTOCOLO:

- 1.- Incubar la membrana durante 4 minutos con 50 mL de tampón de lavado.
- 2.- Incubar la membrana 30 minutos con 50 mL de tampón de bloqueo.
- 3.- Seguidamente incubar la membrana con 9 mL de solución de anticuerpos.
- 4.- Efectuar 2 lavados durante 15 minutos con 50 mL de tampón de lavado.
- 5.- Equilibrar con 50 mL de tampón de detección durante 5 minutos.
- 6.- Agregar 1 mL de la solución con sustrato en la superficie de la membrana.
- 7.- La quimioluminiscencia será captada a través del equipo *ImageQuant LAS 4000 mini* (GE Healthcare). El tiempo de exposición varía en función de la intensidad de la señal.

SOLUCIONES:

Tampón de bloqueo 10x (50 mL):

<i>Blocking reagent</i> (Roche)	5 g
Tampón de ácido maleico	50 mL

Tampón de lavado (0,5L, pH 7,5)

Ácido maleico	5,8 g
NaCl	4,38 g
Tween20	1,5 mL
H ₂ O mQ c.s.p.	500 mL

Tampón de ácido maleico (0,5 L, pH 7,5):

Ácido maleico	5,8 g
NaCl	4,38 g
Tween20	1,5 mL
H ₂ O mQ c.s.p.	500 mL

Solución sustrato CDP-Star (1mL)

CDP-Star (Roche)	10 µL
Tampón de detección	990 µL

Solución de anticuerpos (9 mL)

Anti-Digoxigenina-AP (Roche)	10 µL
Tampón de bloqueo (Roche)	1 X

Tampón de detección (0,5 L, pH 9,5)

Tris-HCl	6,06 g
NaCl	2,92 g
H ₂ O mQ c.s.p.	500 mL

3.21 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD

La determinación de proteínas total se realiza siguiendo el método de Bradford (1976). Este método se basa en la formación de complejos entre proteínas y el colorante de *Coomassie blue* G-250. Los complejos formados absorben a longitud de onda de 600 nm, de manera que la absorbancia será proporcional a la concentración de proteína de la muestra. Esta determinación ha sido adaptada para ser efectuada en el autoanalizador COBAS MIRA S.

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras, se mezclaron 5 µL de muestra en un volumen de 250 µL de reactivo, utilizando como reactivo el BioRad Protein assay (BioRad). Los valores de A_{600} se interpolaron a una curva patrón obtenida con soluciones de albumina sérica bovina de concentración entre 0,125 y 1 mg/mL.

CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS

3.22 INICIO, MANTENIMIENTO Y CONGELACIÓN DEL CULTIVO CELULAR

El mantenimiento de las líneas celulares se realiza en condiciones estériles. Se trabaja en campana de flujo laminar. Todo el material empleado se esteriliza previamente en la autoclave. Los medios y soluciones se compran estériles o se esterilizan mediante filtros de 0,22 μm o autoclavado.

3.22.1 Línea celular utilizada

Células HepG2: (ATCC CRL-10741) línea celular derivada de hígado humano. Las células crecen y se mantienen en medio de crecimiento Dulbecco MEM (Gibco) suplementado 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin e incubados a 37 °C con una atmosfera húmeda al 5% de CO_2 .

3.22.2 Medios y reactivos empleados

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco).

SFB: Suero Fetal Bovino (Gibco). Para inactivar las proteínas del complemento se ha de calentar a 56 °C durante 30 minutos.

Penicilina/Estreptomycin: Solución de 10000 U/mL penicilina y 5000 $\mu\text{g/mL}$ estreptomycin (Gibco).

Tripsina: Tripsina-EDTA (1X), (Gibco).

PBS 10X (pH 7,3)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4,3 mM
KH_2PO_4	1,4 mM

3.22.3 Inicio del cultivo celular

Las células se mantienen congeladas a -80 °C por periodos cortos (meses) y por periodos largos (años) se mantienen congeladas en criotubos en nitrógeno líquido.

PROTOCOLO:

- 1.- Descongelar las células rápidamente a 37 °C.
- 2.- Traspasar el contenido del vial a un tubo falcon con 50 mL de medio de cultivo.
- 3.- Centrifugar a 1000 rpm durante 2 minutos.
- 4.- Eliminar el sobrenadante. Resuspender las células en un nuevo medio de cultivo.
- 5.- Transferir el contenido del falcon a las placas de cultivo.

3.22.4 Mantenimiento de los cultivos celulares: Tripsinización

La tripsinización nos permite separar las células de la superficie de la placa donde se encuentran adheridas, para diluirlas periódicamente, debido a que la confluencia de las células en cultivo podría causar cambios en sus características bioquímicas y funcionales.

PROTOCOLO:

- 1.- Aspirar el medio.
- 2.- Lavar las células con 5 mL de PBS 1X. Aspirar.
- 3.- Incubar las células con 1 mL de tripsina durante 5 minutos aproximadamente.
- 4.- Disgregar las células con 9 mL de medio completo.
- 5.- Agregar la suspensión de células en un nuevo frasco o placa que contiene la cantidad apropiada de medio para hacer la dilución deseada.

3.22.5 Congelación de células**PROTOCOLO:**

- 1.- Tripsinizar las células.
- 2.- Resuspender con 10 mL medio y transferir a un falcon.
- 3.- Centrifugar a 1000 rpm por 2 minutos a 4 °C. Resuspender las células con 1 mL de medio completo que contiene un 20% de suero fetal bovino (SFB) y un 10% de DMSO.
- 4.- Se procede a la congelación progresiva de las muestras: se congelan las células a -20 °C, pasada 2 – 4 horas se pasan a -40 °C y se guardan a -80 °C o en N₂ líquido.

3.23 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS

La transfección es una técnica que permite introducir ADN exógeno en células eucariotas. En el caso de transfecciones transitorias el ADN exógeno no se integra en el genoma de manera que no se replica juntamente con el ADN genómico de las células ni es transmitida a las células hijas.

Existen diversos protocolos para efectuar una transfección transitoria, entre estos métodos podemos destacar: La transfección con fosfato cálcico, por DEAE-dextra/cloroquina, la electroporación y la transfección facilitada por complejos lipídicos.

3.23.1 Transfección mediante el método de fosfato cálcico

Este método se basa en la coprecipitación del ADN exógeno y el fosfato cálcico, para facilitar la penetración del ADN dentro de la célula (Graham and van der Eb, 1973). La maquinaria de transcripción endógena permitirá la expresión de los genes introducidos.

PROTOCOLO:

- 1.- Preparar la mezcla de ADN a transfectar.

Mezclar para cada 2 pocillos de 3 cm de diámetro	
Construido de interés	4 µg
pCMVβ (control de la transfección)	0,5 µg
Plásmido que codifica el factor de transcripción de interés	0,4 µg
H ₂ O mQ c.s.p.	180 µL

- 2.- Agregar a la mezcla 20 µL de CaCl₂ 2,5 M y mezclar con el vórtex.
- 3.- Agregar gota a gota 200 µL de BBS 2X mientras se está homogeneizando en el vórtex.
- 4.- Incubar durante 16 – 24 horas
- 5.- Lisar las células.

SOLUCIONES:

BBS 2X

BES pH 7*	100 mM
NaCl	5 M
Na ₂ HPO ₄	0,5 M
H ₂ O mQ c.s.p.	50 mL

*El pH adecuado para favorecer la formación de precipitado es aproximadamente 7,2.

3.24 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL

3.24.1 Recolección de células.

Para obtener los extractos celulares a partir de células transfectadas se utilizó el reactivo de lisis *Cell Culture Lysis Reagent–CCLR* (Promega).

PROTOCOLO:

- 1.- Aspirar el medio y lavar cada pocillo de la placa con 1 mL de PBS 1X.
- 2.- Aspirar el PBS y agregar 300 µL del reactivo CCLR a cada pocillo.
- 3.- Dejar actuar el CCLR hasta que se observa que las células se desprenden de la placa.
- 4.- Transferir el lisado y centrifugar 15 segundos a temperatura ambiente.
- 5.- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

3.24.2 Ensayo de la actividad β -galactosidasa

Las transfecciones se han llevado a cabo incluyendo en la mezcla de transfección un plásmido que codifica el gen de la β -galactosidasa bajo el control del promotor del citomegalovirus (pCMV β). Los resultados obtenidos en los ensayos de la β -galactosidasa han sido utilizados para normalizar la eficiencia de transfección.

PROTOCOLO:

1.- Mezclar 50 μ L del lisado celular con 100 μ L de la siguiente mezcla de reacción.

MgCl ₂	0,3 mM
ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido)	0,9 mM
β -Mercaptoetanol	13,5 mM
Tampón fosfato pH 7,5	0,1 M

2.- Incubar a 37 °C hasta que la mezcla adquiera una coloración amarilla.

3.- Parar la reacción con 250 μ L de Na₂CO₃ 0,5 M. y leer a DO₄₂₀

SOLUCIONES:

ONPG (AppliChem)

Se prepara una solución de 4 mg/mL de ONPG en tampón 0,1 M Na₂PO₄ pH 7,5.

Tampón fosfato

NaH ₂ PO ₄	0,2 M
Na ₂ HPO ₄	0,2 M
H ₂ O mQ c.s.p.	100 mL

3.24.3 Ensayo de la actividad luciferasa

La actividad luciferasa es medida en 5 μ L del lisado después de la adición de 20 μ L de *Luciferase Assay Reagent*. Este reactivo contiene luciferina, que es utilizada como sustrato para la luciferasa expresada en las células, dando como resultado luminiscencia, que puede ser detectada en un luminómetro (*Luminometer Turner Design TD-20/20*).

3.24.4 Análisis de los resultados

Para determinar las veces de inducción de la actividad luciferasa respecto al control, se divide la actividad luciferasa entre el valor de la absorbancia del ensayo de la β -galactosidasa, con el fin de normalizar la actividad por la eficiencia de transfección. El valor del control es dividido entre todas las otras condiciones, obteniendo así las veces de inducción de la actividad luciferasa relativa al control.

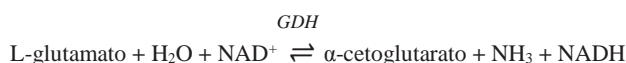
ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de las enzimas analizadas está expresada en actividad específica Unidades/gramo (U/g) de proteína total del extracto.

3.25 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GDH

El L-glutamato se desamina convirtiéndose a α -cetoglutarato en una reacción reversible, catalizada por GDH. Durante esta reacción se oxidan o se reducen los cofactores NADH o NAD^+ dependiendo de la dirección de la reacción.

REACCIÓN:



3.25.1 Determinación de la actividad GDH (dirección de oxidación de NADH)

La medición de la reacción de la actividad GDH fue medida mediante la oxidación de NADH a NAD^+ , que se utiliza de forma equimolar al sustrato α -cetoglutarato para formar L-glutamato. Este ensayo está basado en el método descrito por Storey, Fields y Hochachka (1978), adaptado para su automatización en COBAS MIRA S.

PROTOCOLO:

- 1.- Hacer una mezcla para un volumen final de 250 μL .

	Reactivo	Concentración final
R1	Imidazol-HCl, pH 7,4	50 mM
	Acetato de amonio	250 mM
	α -cetoglutarato ¹	5 mM
	NADH ¹	0,1 mM
	ADP	1 mM
	H ₂ O mQ c.s.p.	250 μL
	Extracto crudo	4 μL

¹El α -cetoglutarato (Sigma) y NADH (Sigma) se preparan al momento de cada ensayo.

- 2.- La reacción se lleva a cabo a 30 °C. El inicio de la reacción se da por la adición de 4 μL de muestra a los 246 μL de la reacción.
- 3.- Se registra el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADH.

*Una unidad de actividad enzimática se definió como la actividad necesaria capaz de consumir 1 μmol de NADH por minuto.

3.25.2 Determinación de la actividad GDH (dirección de reducción de NAD⁺)

La medición de la reacción inversa de la actividad GDH fue medida mediante la reducción de NAD⁺ a NADH, que se utiliza de forma equimolar al sustrato L-glutamato para formar α -cetoglutarato y NH₃. Este ensayo está basado en el método descrito por Pérez y colaboradores (1989), adaptado para su automatización en COBAS MIRA S.

PROTOCOLO:

- 1.- Hacer una mezcla para un volumen final de 200 μ L.

	Reactivo	Concentración final
R1	Tris-HCl, pH 9,0	154 mM
	L-glutamato	20 mM
	Hidrazina	100 mM
	NAD ⁺ 2	1 mM
	ADP	1 mM
	H ₂ O mQ c.s.p.	200 μ L
	Extracto crudo	4 μ L

¹Las soluciones de NAD⁺ (Sigma) se prepara antes de cada ensayo.

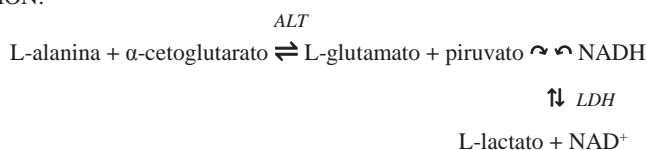
- 2.- La reacción se lleva a cabo a 30 °C. El inicio de la reacción se da por la adición de 4 μ L de muestra a los 196 μ L de la reacción.
- 3.- Se registra el aumento de absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADH por minuto.

* Una unidad de actividad enzimática se definió como la actividad necesaria para producir 1 μ mol de NADH por minuto.

3.26 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALT

La medición de la actividad alanina aminotransferasa (ALT) mediante la transaminación de L-alanina a α -cetoglutarato para formar L-glutamato y piruvato, fue medida mediante el acoplamiento de una segunda reacción enzimática, en la que se utiliza uno de los productos de la reacción (piruvato) como sustrato de la reacción acoplada. En la segunda reacción la LDH utiliza NADH como cosustrato, de forma equimolar respecto al sustrato de la reacción (piruvato).

REACCIÓN:



PROTOCOLO:

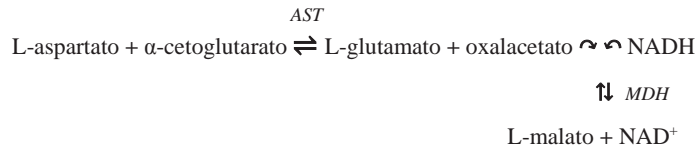
- 1.- Hacer una dilución 1:100 de las muestras en Tampón de homogeneización.
- 2.- Seguimos las intrucciones del Kit comercial ALT-GPT BR (Linear Chemicals)
- 3.- La reacción se mide a 30 °C en el autoanalizador espectrofotometrico Cobas Mira S (Hoffman-Roche), monitorizando la oxidaxión de NADH a 340 nm.

*La unidad de actividad ALT se definió como la cantidad de enzima capaz de consumir 1 μmol de NADH por minuto.

3.27 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AST

La medición de la actividad aspartato aminotransferasa (AST) mediante la transaminación de L-aspartato a α-cetoglutarato para formar L-glutamato y oxalacetato, fue medida mediante el acoplamiento de una segunda reacción enzimática, en la que se utiliza uno de los productos de la reacción (oxalacetato) como sustrato de la reacción acoplada. En la segunda reacción la MDH utiliza NADH como cosustrato, de forma equimolar respecto al sustrato de la reacción (oxalacetato), y que se oxida a NAD⁺.

REACCIÓN:



PROTOCOLO:

- 1.- Hacer una dilución 1:100 de las muestras en Tampón de homogeneización.
- 2.- Seguimos las instrucciones del Kit comercial AST-GOT BR (Linear Chemicals)
- 3.- La reacción se mide a 30 °C en el autoanalizador espectrofotométrico Cobas Mira S (Hoffman-Roche), monitorizando la oxidación de NADH a 340 nm.

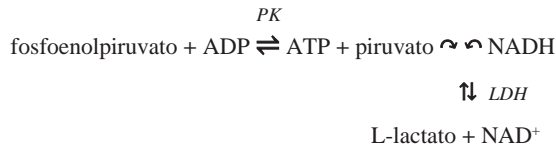
*La unidad de actividad AST se definió como la cantidad de enzima capaz de consumir 1 μmol de NADH por minuto.

3.28 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PK

La medición de la PK mediante la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato a ADP, para formar una molécula de piruvato y otra de ATP, fue medida mediante el acoplamiento de una segunda reacción enzimática, en la que se utiliza uno de los productos de la reacción (piruvato) como sustrato de la reacción acoplada. En la segunda reacción la LDH utiliza NADH como cosustrato, de forma equimolar respecto

al sustrato de la reacción (piruvato), y que se oxida a NAD^+ . Este ensayo está basado en el de Staal y colaboradores (1975), adaptado para automatización en COBAS MIRA S.

REACCIÓN:



PROTOCOLO:

1.- Hacer una mezcla para un volumen final de 200 μL .

	Reactivos	Concentración final
R1	Glicina pH 7,4	88,9 mM
	MgCl_2	0,012 M
	KCl	0,12 M
	NADH^1	0,15 mM
	PEP	2,5 mM
	LDH^1	21 U/mL
R2	ADP	2,5 mM
	Extracto crudo	2,5 μL

¹ Las soluciones de NADH (Sigma) y LDH (Sigma) se preparan antes de cada ensayo.

2.- La reacción se lleva a cabo a 30 °C. El inicio de la reacción se da al añadir la solución de ADP (R2) a la mezcla del ensayo R1, que fue previamente incubada con 2,5 μL de muestra (obtenida según apartado 3.1.1) durante 5 minutos.

3.- Se registra el descenso de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADH .

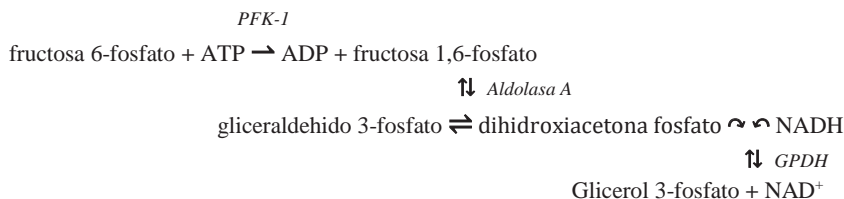
*Una unidad de actividad enzimática se definió como la actividad necesaria para consumir 1 mol de NADH por minuto.

3.29 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PFK-1

La medición de la actividad PFK-1 mediante la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la fructosa 6-fosfato, para formar fructosa 1,6-bifosfato y adenosín difosfato ADP, fue medida mediante el acoplamiento de tres reacciones enzimáticas. Se utiliza la fructosa 1,6-bifosfato como sustrato de la reacción acoplada catalizada por la aldolasa A. En la segunda reacción enzimática acoplada se utiliza el gliceraldehído 3-fosfato como sustrato de la reacción catalizada por la triosa fosfato isomerasa (TPI). Por último, la tercera reacción enzimática acoplada utiliza la dehidroxiacetona fosfato como sustrato del glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH). En la tercera reacción la GPDH

utiliza NADH como cosustrato, de forma equimolar respecto al sustrato de la reacción (dehidroxiacetona fosfato), y que se oxida a NAD⁺. Este ensayo está basado en el de Castaño, Nieto y Feliu, (1979), adaptado para su automatización en COBAS MIRA S.

REACCIÓN:



PROTOCOLO:

1.-Hacer una mezcla para un volumen final de 200 μL .

	Reactivos	Concentración final
R1	Tris-HCl, pH 8,25	105 mM
	MgCl ₂	0,05 mM
	KCl	0,05 mM
	Sulfato de amonio	4 mM
	β -mercaptoetanol	12 mM
	F6P	10 mM
	NADH ¹	0,15 mM
	G6P	30 mM
	Aldolasa ²	0,7 U/mL
	TPI ²	5 U/mL
	GPDH ²	2 U/mL
R2	ATP	1 mM
	Extracto crudo	4 μL

¹ La solución de NADH (Sigma) se prepara antes de cada ensayo.

² las enzimas auxiliares aldolasa, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), y Triosa P-isomerasa (TPI) fueron previamente desaladas por centrifugación y resuspendida en tampón Tris-HCl pH 8,25.

- 2 La reacción se lleva a cabo a 30 °C. El inicio de la reacción se da con la adición de 20 μL de ATP (R2), a la mezcla formada por 4 μL de muestra más 176 μL de reactivo R1.
- 3 Se registra el descenso de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADH.

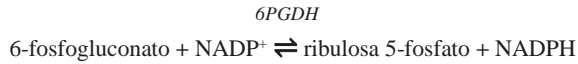
*Una unidad de actividad enzimática se definió como la actividad necesaria para consumir 1 mol de NADH por minuto.

3.30 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD 6PGDH

La medición de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) mediante la oxidación de 6-fosfogluconato a ribulosa 5-fosfato, fue medida mediante la reducción de

NADP⁺ a NADPH, de forma equimolar respecto al sustrato de la reacción (6-fosfogluconato). Este ensayo está basado en el método manual descrito por Beutler y Kuhl, (1986), adaptado para su automatización en COBAS MIRA S.

REACCIÓN:



PROTOCOLO:

1.-Hacer una mezcla para un volumen final de 200 μL .

Reactivos	Concentración final
R1	
Imidazol-HCl, pH 7,4	82,7 mM
MgCl ₂	0,003 M
6-fosfogluconato	2 mM
NADP ⁺¹	0,5 mM
Extracto crudo	4 μL

¹ La solución de NADP⁺ (Sigma) se prepara antes de cada ensayo.

2.- La reacción se lleva a cabo a 30 °C. El inicio de la reacción se da por la adición de 4 μL de muestra a los 196 μL del reactivo R1.

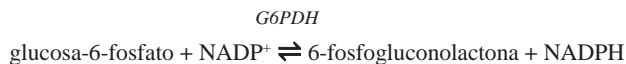
3.-Se registra el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADPH.

*Una unidad de actividad enzimática se definió como la actividad necesaria para producir 1 mol de NADPH por minuto.

3.31 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD G6PDH

La medición de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) mediante la oxidación de glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconolactona, fue medida mediante la reducción de NADP⁺ a NADPH, de forma equimolar respecto al sustrato de la reacción (glucosa-6-fosfato). Este ensayo está basado en el método manual descrito por Lee, (1982), adaptado para su automatización en COBAS MIRA S.

REACCIÓN:



PROTOCOLO:

1.- Hacer una mezcla para un volumen final de 200 μL .

Reactivos	Concentración final
R1	
Imidazol-HCl, pH 7,4 ¹	77,5 mM
MgCl ₂ ¹	0,005 M
Glucosa-6-fosfato ¹	1 mM
NADP ²	1 mM
Extracto crudo	4 uL

¹ Las soluciones de Imidazol-HCl, MgCl₂ y glucosa-6-fosfato se guardan en alícuotas a -20 °C.

² La solución de NADP (Sigma) se prepara antes de cada ensayo.

2.- La reacción se lleva a cabo a 30 °C. El inicio de la reacción se da por la adición de 4 µL de muestra a los 196 µL del reactivo R1.

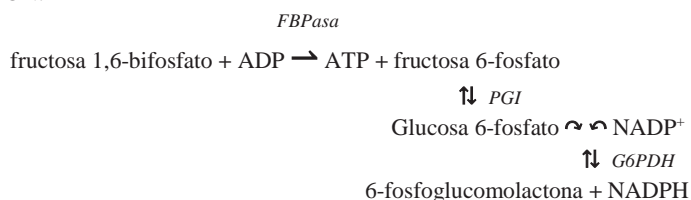
3.- Se registra el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADPH por minuto.

* Una unidad de actividad enzimática se definió como la actividad necesaria para producir 1 µmol de NADPH por minuto.

3.32 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FBPasa-1

La medición de la actividad FBPasa-1 mediante la transferencia de un grupo fosfato de la fructosa 1,6-bifosfato a la ADP, para formar glucosa 6-fosfato y ATP, fue medida mediante el acoplamiento de tres reacciones enzimáticas. Se utiliza fructosa-6-fosfato como sustrato de la reacción acoplada catalizada por la glucosa 6-fosfato isomerasa (PGI). En la segunda reacción enzimática acoplada se utiliza la glucosa 6-fosfato como sustrato de la reacción catalizada por la G6PDH. En la tercera reacción la G6PDH utiliza NADP⁺ como sustrato de forma equimolar respecto al sustrato de la reacción (6-fosfogluconolactona) y que reduce a NADPH. Este ensayo está basado en el método de Ekdahl y Ekman, (1985), para su automatización en COBAS MIRA S.

REACCIÓN:



PROTOCOLO:

1.- Hacer una mezcla para un volumen final de 200 µL.

	Reactivos	Concentración final
	Imidazol-HCl, pH 7,4	85 mM
	MgCl ₂	0,005 mM
	NADP ¹	0,5 mM
R1	β -mercaptoetanol	12 mM
	Fructosa 1,6-bifosfato	0,05 mM
	PGI	2,5 U/mL
	G6PDH	0,48 U/mL
	Extracto crudo	4 μ L

¹ La solución de NADP (Sigma) se prepara antes de cada ensayo.

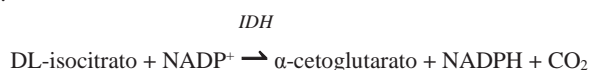
- 2.- La reacción se lleva a cabo a 30 °C. El inicio de la reacción se da por la adición de 4 μ L de muestra a los 196 μ L de la mezcla de reacción R1.
- 3.- Se registra el incremento de la absorbancia 340 nm debido a la aparición de NADPH.

*Una unidad de actividad FBPasa se definió como la cantidad de enzima capaz de producir 1 μ mol de NADPH por minuto.

3.33 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD IDH

La medición de la actividad isocitrato deshidrogenasa (IDH) fue medida mediante la reducción de NADP⁺ a NADPH, que se utiliza de forma equimolar al sustrato isocitrato para formar α -cetoglutarato y CO₂. Este ensayo está basado en el método descrito por Londesborough y Dalziel, (1968), adaptado para el uso en COBAS MIRAS.

REACCIÓN:



PROTOCOLO:

- 1.- Hacer una mezcla para un volumen final de 200 μ L.

	Reactivos	Concentración final
	TEA, pH 7,5	80 mM
R1	DL-isocitrato	3,7 mM
	NaCl ¹	42 mM
	H ₂ O mQ c.s.p.	174 μ L
R2	NADP ¹	0,032 mM
	MnSO ₄	3,9 mM
	Extracto crudo	4 μ L

¹ La solución de NADP⁺ (Sigma) se prepara antes de cada ensayo.

- 2.- Adicionar 4 μ L de la muestra a los 174 μ L del reactivo R1.
- 3.- La reacción se lleva a cabo a 30 °C. El inicio de la reacción se da por la adición de 22 μ L del reactivo R2.

4.- Se registra el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADPH por minuto.

* Una unidad de actividad enzimática se definió como la actividad necesaria para producir 1 μmol de NADPH por minuto.

3.34 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD OGDH

La medición de la actividad alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (OGDH) fue medida mediante la reducción de NAD^+ a NADH, que se utiliza de forma equimolar al sustrato α -cetoglutarato para formar succinil-CoA y CO_2 . Este ensayo está basado en el método descrito por Martius y Lynen, (1950), adaptado para su automatización en COBAS MIRA S.

REACCIÓN:

OGDH



PROTOCOLO:

1.- Hacer una mezcla para un volumen final de 200 μL .

Reactivos	Concentración final
Tampón fosfato, pH 7,4	50 mM
MgCl_2	2 mM
Tiamina pirofosfato	0,6 mM
NAD^{+1}	2 mM
α -cetoglutarato	10 mM
EGTA	0,2 mM
ADP	0,4 mM
H_2O mQ c.s.p.	162,7 μL
R2 HS-CoA	0,12 mM
Extracto crudo	4 μL

¹ La solución de NAD (Sigma) se prepara antes de cada ensayo.

2.- Adicionar 4 μL de la muestra a los 162.7 μL del reactivo R1.

3.- La reacción se lleva a cabo a 30 °C. El inicio de la reacción se da por la adición de 22 μL del reactivo R2.

4.- Se registra el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADH por minuto.

* Una unidad de actividad enzimática se definió como la actividad necesaria para producir 1 μmol de NADH por minuto.

DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

3.35 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA SÉRICA

Para la determinación de glucosa hemos utilizado el kit GLUCOSA (Linear Chemicals) adaptado a la determinación en COBAS MIRA S. El método se basa en la determinación de la formación de NADH con la oxidación de la β -D-glucosa de las muestras; el seguimiento de la reacción se efectuó por el incremento de la absorbancia a 340 nm. La glucosa en suero se determinó con muestras obtenidas como se detalla en el apartado 3.1.1. La cuantificación se efectuó interpolando los valores de absorbancia observados para las muestras en una recta de calibración obtenida mediante estándares de glucosa a concentraciones entre 6,25 y 200 mg/dl.

3.36 DETERMINACIÓN DE ALFA-CETOGLUTARATO

3.36.1 Obtención de extracto hepático para la determinación de metabolitos

El análisis de pequeñas moléculas en muestras biológicas es frecuentemente obstaculizado por la presencia de proteínas y enzimas activas. Para realizar algunos bioensayos se requieren la eliminación de la proteína de las muestras antes del análisis. La precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA), no sólo elimina la mayor parte de las proteínas presentes, sino que también, estabiliza muchas de las moléculas pequeñas a analizar.

Precipitación de proteínas.

PROTOCOLO:

- 1.- Pesar 50-100 mg de tejido hepático y agregar rápidamente 500 μ L de TCA 1M a 4°C.
- 2.- Mantener las muestras en hielo y homogeneizarlas durante 30 segundos, utilizando un POLYTRON-PTA 7 en posición 3; se coloca el homogenado en tubos eppendorf.
- 3.- Centrifugar a 4 °C durante 30 minutos a 10000 g para eliminar componentes sólidos insolubles.
- 4.- Neutralizamos el sobrenadante con KOH 2M a 4 °C hasta alcanzar un pH neutral (pH 6,8 – 7,2).
- 5.- Centrifugar a 4 °C durante 15 minutos a 13000 g.
- 6.- Colectar el sobrenadante y conservar las muestras a -20 °C hasta su análisis.

3.36.2 Determinación de α -cetoglutarato

La medición de la concentración de α -cetoglutarato en los extractos hepáticos fue medida mediante la reducción de NADH a NAD⁺ por la enzima GDH, que utiliza de forma equimolar al sustrato α -cetoglutarato para formar L-glutamato y NH₃. Este ensayo está basado en el método descrito por Helmreich y colaboradores, (1954), adaptado para su automatización en COBAS MIRA S.

PROTOCOLO:

- 1.- Hacer una mezcla para un volumen final de 200 μ L.

	Reactivo	Concentración final
R1	Imidazol-HCl, pH 7,4	50 mM
	NADH ¹	0,1 mM
	GDH (Sigma)	0,37 U/mL
	H ₂ O mQ c.s.p.	200 μ L
	Extracto crudo	75 μ L

¹NADH (Sigma) se preparan al momento de cada ensayo.

- 2.- La reacción se lleva a cabo a 30 °C. El inicio de la reacción se da por la adición de 80 μ L de muestra a los 120 μ L de la reacción.
- 3.- Se registra el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADH.
- 4.- La cuantificación se efectuó interpolando los valores de absorbancia observados para las muestras en una recta de calibración obtenida mediante estándares de α -cetoglutarato a concentraciones entre 0.023 y 0.375 mM.

*Una unidad de actividad enzimática se definió como la actividad necesaria para consumir 1 μ mol de NADH por minuto.

3.37 DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR HPLC

La determinación de aminoácidos libres se llevó a cabo en el laboratorio de Técnicas separativas de los servicios científicos técnicos de la Universidad de Barcelona (CCiT-UB).

3.37.1 Preparación de la muestra

Para la determinación de la concentración de aminoácidos, las muestras siguieron el protocolo de desproteinización según el apartado 3.36.1. Adicionalmente se filtraron a través de un filtro de *Millipore* de 10 KDa y posteriormente se ajustaron a pH 7.5 con NaOH. La L-norleucina (Sigma) se usó como patrón interno, agregándose 50 μ L al inicio de la toma de muestra.

3.37.2 Análisis cuantitativo

La composición de aminoácidos y moléculas relacionadas se analizó mediante cromatografía de intercambio catiónico seguida de derivatización post-columna con ninhidrina y detección UV / VIS (Moore et al., 1958). La separación cromatográfica se realizó usando un analizador Biochrom de 30 aminoácidos (Biochrom), equipado con columna PEEK empaquetada con resina de intercambio catiónico Ultropac (columna fisiológica de alto rendimiento de litio) y sistema de calentamiento/enfriamiento Peltier (Biochrom). Después de la inyección de las muestras, se aplicó una elución en gradiente con una combinación de cinco tampones de citrato de litio de pH creciente (2,80 -3,55) y fuerza iónica (0,2 M-1,65 M). Los efluentes de la columna reaccionaron con ninhidrina en una bobina de reacción con control de temperatura a 135 °C y los aminoácidos derivatizados se detectaron colorimétricamente a 570 nm y 440 nm de longitud de onda.

Los picos de aminoácidos se identificaron de acuerdo con los tiempos de retención de los estándares de aminoácidos correspondientes (Sigma-Aldrich). La cantidad de cada aminoácido se calculó mediante el método estándar interno usando respuestas de área de analitos y patrón interno (L-norleucina). La adquisición de datos y el tratamiento se realizaron mediante el software EZChrom Elite (Agilent Technologies).

3.38 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ADN-QUITOSÁN-TPP

Las nanopartículas de quitosán-tripolifosfato (TPP) se utilizaron para vehicular ADN plasmídico hacia el interior de las células del tejido hepático de dorada. Una vez se obtuvo cantidad suficiente de cada plásmido se utilizaron alícuotas de 1 mg de ADN para preparar las nanopartículas de ADN-quitosán-TPP en colaboración con el grupo de investigación de los Dres. Montserrat Miñarro y Josep Ramon Ticó del Departamento de Farmacia y Tecnología, y Físicoquímica (Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de Barcelona), siguiendo el método modificado de gelación iónica de Calvo (Calvo and Remunan-Lopez, 1997), que se describe a continuación.

PROTOCOLO:

- 1.- Lentamente se mezcló quitosán de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich, MA, USA) con una solución de tampón acetato a pH 5,0 hasta alcanzar una concentración de 2 mg/mL.
- 2.- Se agitó vigorosamente durante 3 horas hasta disolver el quitosán.

- 3.- Se filtró la solución para remover trazas de quitosán no disueltos.
- 4.- Se añadió 300 μg de plásmido a 1,2 mL. De una solución de 0,84 mg/mL TPP (Panreac, Castellar del Valles, Barcelona, España).
- 5.- Bajo agitación magnética a 800 rpm se añadió, gota a gota, la solución del plásmido-TPP a 3 mL de la solución de quitosán hasta alcanzar una relación 1:0,4 quitosán/TPP.
- 6.- Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 15 °C para recuperar las nanopartículas.
- 7.- Las nanopartículas se lavaron dos veces con agua ultra pura.
- 8.- Se resuspendieron en 2 mL de solución de manitol al 2 % (p/v) mediante agitación con vórtex.
- 9.- Se secaron mediante freeze-drying a 47 °C.
- 10.- Para eliminar residuos de moléculas de agua se realizó un segundo secado a 25 °C.
- 11.- El producto liofilizado se conservó a -20 °C hasta su utilización.

3.39 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (DE). Se utilizó el programa SPSS 23.0 para *Windows* (SPSS Inc.). La comparación de grupos se llevó a cabo mediante *ANOVA* de una vía y se identificaron diferencias entre grupos mediante la aplicación del *post-hoc* Bonferroni. Para comparar medias entre dos grupos se realizó el *test t-Student*.

4. RESULTADOS

4.1 CLONACIÓN DEL ARNm DE GDH DE *S. AURATA*

A partir de la secuencia previamente clonada por nuestro grupo y descrita para GDH de *S. aurata* en la base de datos del GenBank (JX073708.1) se diseñaron unos oligonucleótidos para completar la obtención de los extremos 5' y 3' del ADNc codificante para GDH mediante la técnica de *RACE* 5' y 3' acoplado a PCR a partir de ARN total aislado de hígado de dorada.

Para obtener el extremo 5', se realizó una ronda de PCR-*RACE* 5' en la cual se utilizaron los oligonucleótidos CG1307 y 5'-*RACE* *outer primer* para la PCR primaria, y los oligonucleótidos CG1308 y 5'-*RACE* *inner primer* para la PCR secundaria. Para obtener el extremo 3', se realizó una ronda de PCR-*RACE* 3' en la cual se emplearon los oligonucleótidos CG1305 y 3'-*RACE* *outer primer* para la PCR primaria y los oligonucleótidos CG1306 y 3'-*RACE* *inner primer* para la PCR secundaria.

Con el fin de analizar la secuencia del ADNc obtenida a partir de las diferentes PCRs, se diseñaron dos oligonucleótidos, CG1333 y CG1334, que permiten amplificar la secuencia completa del ARNm de GDH a partir de ADNc de hígado de dorada. El producto de amplificación de esta última PCR se subclonó en el vector pGEM-T *Easy* para ser posteriormente secuenciado. Como resultado, se obtuvo una secuencia nucleotídica con un total de 2715 pb, que fue sometida a la base de datos GenBank con el número de acceso MF459045.

La secuencia clonada de 2715 pb contiene un marco abierto de lectura (ORF) de 1629 pb. El ATG inicial del ORF está incluido en una secuencia *consensus* para la iniciación transcripcional en vertebrados (Kozak, 2002). Un codón de parada se encuentra situada a 12 pb en la región 5' corriente arriba del ATG inicial, indicando así que dicha región incluye el inicio de traducción. Así mismo, el mensajero clonado dispone de una señal de poliadenilación (AATAAA) que se encuentran a 20 pb corriente arriba de la cola de poli(A+). La secuencia de aminoácidos deducida para GDH de dorada predice una proteína de 542 aa, con una masa molecular calculada de 59,67 kDa.

```

1 cccactggccagaggacgggacacggtgaggagctgctgtgcttcaattctaccoccc
61 ttctctgctgctcaccocccattgtcctgtgtgttagttgacctttatagttcgtttac
      M Y R Y F G E L L S R S A 13
121 acggttagctagtttttagtcaATGTACCGGTATTTCCGGGAGCTGCTGAGCCGCTCTCGGG
      G S A L A S G C V D S A L P V S S L M 33
181 GCAAGTCCCTGGCCTGGGGTGCCTGGACTCCGCTCTCCCGGTGCTCGTCCCTGATGC
      R V C H Y A D A A D K P D D P N F F K M 53
241 GGTCTGTACTATGCCGATGCGCGGACAAGCCCGACGCCCTAACTTCTTCAAGATGG
      V E G I F D R G A T I V E D K L V E D L 73
301 TCGAGGGCATCTTCGACCCGCGGCCACCATCGTGGAGGACAAGCTGGTGGAGATCTGA
      K T R E T P E Q K R H R V R G I L R I I 93
361 AGACCAGGGAGACCCCGAGCAGAAGCGGCACCGTGTGCGTGGCATCTCGCATCATCA
      K P C N H V L S V S F P I K R D N G E W 113
421 AGCCCTGTAAATCAGTCTGAGCGTGTCTTCCCATCAAGGGGATAACGGAGAGTGGG
      E V V E G Y R A Q H S Q H R T P C K G G 133
481 AGTTTGGAGGGGTACCGCGCCAGCACAGCCAGCAGAACACCCCTGCAAAGGAGGTA
      I R Y S T D V S V D E V K A L A S L M T 153
541 TCCGTACAGTACAGATGTGTCTGTGGATGAAGTCAAGCCTGGCCTCTGTGATGACCT
      Y K C A V V D V P F G G A K A G V K I N 173
601 ACAATGCTCCCTGTTGATGTGCCATTTGGTGGAGCAAAGCTGGAGTCAAGATCAACC
      P R N Y S D N E L E K I T R R F T I E L 193
661 CCAGGAATTACTCTGATAATGAGCTGGAGAAGATTACCAGGAGATTCACATTCGAGCTGG
      A K K G F I G P G I D V P A P D M S T G 213
721 CCAAGAGGGTTTTTTCGGACCTGGCATCGACTCCAGCCCGACAGCATGAGCAGGAG
      E W E M S W I A D T Y A N T I A H T D I 233
781 AGTGGAAATGTCTGGATGGCGACACATATGCAACACCATCGCACACACTGATATCA
      N A H A C V T G K P I S Q G G I H G R I 253
841 ATGCCACCGATGTGTGACAGGAAAGCCCATCAGCCAGGAGGATCCACGGTCCGATCT
      S A T G R G V F H G I E N F I N E A S Y 273
901 CAGCCACTGGTCCGCGAGTCTTCCATGGCATCGAAGCTTCAATTAACGAGCGTCTACA
      M S M V G L T P G F Q D K T F I I Q G F 293
961 TGAGCATGGTGGCCCTGACACAGGCTTCCAGGACAAGACCTTCAATTAACGAGCGTCTTG
      G N V G L H S M R Y L H R F G A K C V G 313
1021 GTAATGGGGTCTCCACTCCATGAGTATCTGCACAGTTTGGGCAAGTGTGTGGAA
      I A E I D G A I H N P D G I D P K Q L E 333
1081 TCGCTGAGATTTGATGGAGCCATCCACACCCAGATGGCATCGACCCAAACAGCTGGAGG
      D Y K L N N G T I V G F P G A K P Y E G 353
1141 ACTACAACTGAAACAATGGCACCATTTGGTCTCCCGGAGCCAAAGCCCTACGAGGGGA
      N I L E A D C H I L I P A A G E K Q L T 373
1201 ACATTTTGGAGCCGACTGTCACATCTGATCCCTGCTGCCGAGAGAAGCAGCTCACAC
      R N N A S R I K A K I I A E G A N T G 393
1261 GTAACAACCCCTCCAGGATCAAGGCCAAGATCATTGCTGAGGGTGCAATGGGGCCACCA
      T P D A D K I F L E N N V M V I P D M Y 413
1321 CCCCAGATGCTGACAAGATCTTCTGGAGAACAACGTCATGGTTATCTGACATGACT
      L N A G G V T V S Y F E W L K N L N H V 433
1381 TGAATGCTGGTGGTGTGACAGTGTCTTATTTCGAGTGGCTGAAGAATCTCAACATGCA
      S Y G R L T F K Y E R D S N Y H L L M S 453
1441 GCTATGGAAGACTGACCTTCAAATATGAGAGGGACTCAAACCTACCATCTGCTCATGTCTG
      V Q E S L E R K F G K Q G G P I P V V P 473
1501 TGCAGGAGAGTTTGGAGAGGAAGTTGGCAAAACAGGGAGGACCCATCCCTGTTGTCCTA
      T A D F Q A R V A G A S E K D I V H S G 493
1561 CGCTGACTTCCAGGCCAGAGTTGCTGGTGCCTCTGAGAAGATATCGTTCACTCTGGGT
      L A Y T M E R S A R Q I M R T A S K Y N 513
1621 TGGCTACACCATGGAGAGATCAGCCAGGCAAATCATGCGCACAGCAAGCAAGTACACC
      L G L D L R T A A Y V N A I E K V F K V 533
1681 TGGTCTGGACCTTCGAGCGCCGCTACGTCAACGCCATCGAGAAGGCTTCAAAGTCT
      Y N E A G L T F T * 542
1741 ACAATGAGCTGGACTTACCTTACATATAAaggccaatcaagcccgacctctctctct
1801 tccccccccctcctgctattctccccctctaaacagccttcagaacatatacctggtt
1861 accgctgcttttaaaaaacacacacagatgcaatcgcacacacacacacacacacagtgac
1921 tttggctagcctgggtttatcctgtgatgtctgtgctgccattatactgattctctctgt
1981 gaagctctgcccctctctctgtttttgctcaaggttatatgagaaaaagcagatggcgag
2041 taacatcccagacagaataaaaagaccccctgcccctcccagcccctcaatagaaaacacc
2101 acaatattgttgatggcagccatgtcaaaagcgcctttatgcggtcgtgaatgcaccg
2161 tgtgactctccagttgcatatttcagttgacagcccctcagatgscctatttcagaaa
2221 gagggtgctgtgagaggaagatggccacttcagtttaattcaacaaaagggatttag
2281 atttaacgtcaatgtaataaagagaatagtcattttattactcttgagtttatctctca
2341 ctctcagatgtaaaagttactagtgaaagtggcaaatatttaggtttcccaaatctactt
2401 catagttggtgtttttactgttagactccattaaagcccctctctcccocccctcacccc
2461 tctctctctctctctgctttatctcgtatataaaagcagctctctcccgaactctccc
2521 gctggccagaagaagaggagcagggattggggggctgaagtgtcactgtgaccccgctccc
2581 ctggttgattttctcagttttaatcgtccagttccttgacgtgaaattggtgttaag
2641 gaaattattttttttttttatgcatctttttttggaaaccaataaagttgttcaga
2701 aaaaataaaaaaaaaa

```

Figura13. Secuencia nucleotídica y aminoácídica deducida para GDH de *S. aurata*.

Los nucleótidos correspondientes al marco abierto de lectura aparecen en mayúsculas, mientras que las regiones 5' y 3' UTR están representadas en minúsculas. Los codones de inicio (ATG) y de parada (TAA) aparecen en negrita. La secuencia de poliadenilación 3' está subrayada. La secuencia aminoácídica deducida para GDH de *Sparus aurata* está representada en negrita y mayúscula.

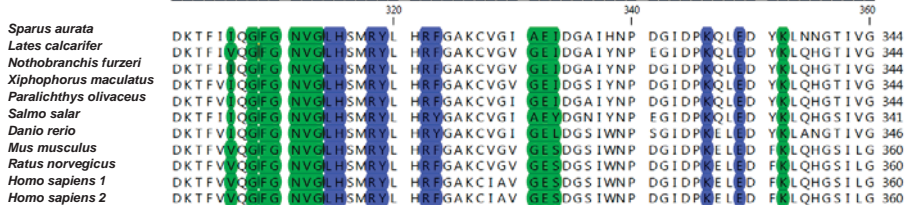
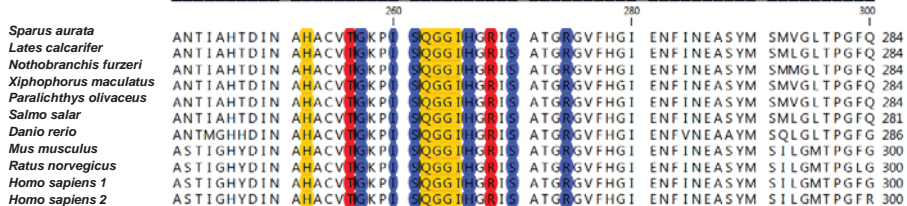
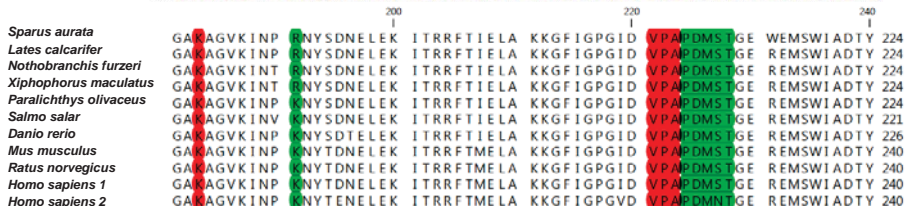
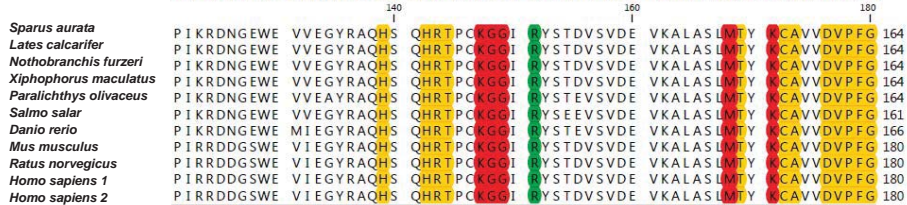
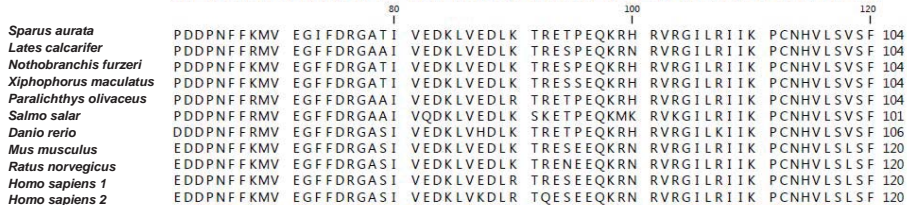
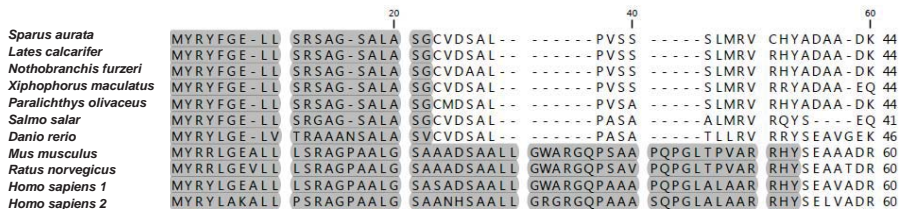
4.1.1 Alineamiento múltiple y diagrama filogenético de GDH de *S. aurata*

Para investigar la relación filogenética de GDH de dorada con otros vertebrados, la secuencia descrita fue apilada con otras secuencias utilizando el programa *CLC-Sequence Viewer 7.8.1* y posteriormente predecir un diagrama filogenético. La secuencia de dorada fue apilada con las secuencias descritas para *Nothobranchis furzeri* (XP_015818399.1), *Xiphophorus maculatus* (XP_005794695.1), *Lates calcarifer* (XP_018531054.1), *Paralichthys olivaceus* (XP_019938702.1), *Salmo salar* (NP_001117108.1), *Danio rerio* (NP_997741), *Mus Musculus* (NP_032159.1), *Ratus norvegicus* (NP_036702.1), *Homo sapiens* GDH1 (NP_005262.1) y *Homo sapiens* GDH2 (NP_036216.1).

La secuencia de aminoácidos inferido para GDH de *S. aurata* se alineó con ortólogos de GDH para explorar relaciones evolutivas. La GDH de *S. aurata* mantiene todos los residuos considerados importantes para la unión de glutamato y GTP (16 y 15 residuos de aminoácidos respectivamente) y la mayoría de los aminoácidos implicados en NAD + (20 de 25), ADP (26 de 27) y los vinculados a la unión de pirofosfato de tiamina (5 de 6) (Figura 14). (Bunik et al., 2016). En el análisis informático con TargetP 1.1 (Nielsen et al., 1997; Emanuelsson et al., 2000) señalan una alta probabilidad de que el ADNc de GDH codifique una proteína que se localiza en la mitocondria, que contiene un péptido de dirección mitocondrial con sitio de escisión putativo en la posición 20. (Figura 14).

El análisis del apilamiento nos indica que la secuencia encontrada muestra alta identidad con peces de la subdivisión *Percomorphaceae*, a la que pertenece *S. aurata*: un 97,05 % con *L. calcarifer*, 96,86 % con *N. furzeri*, 96,68 % con *P. olivaceus*, y 96,31 % con *X. maculatus*. Con peces más alejados filogenéticamente, como *S. salar* y *D. rerio*, muestra una identidad del 92.58 y 87.45 % respectivamente. Si comparamos con otros vertebrados, *S. aurata* comparte una identidad del 83 % con mamíferos. En cuanto a las isoformas de GDH presentes en humanos, GDH de *S. aurata* conserva una identidad del 83.95% para la isoforma 1 y un 81.18% para la isoforma 2 de la GDH humana (Figura 15).

Finalmente, la región del ADNc codificante para la proteína fue subclonada en el vector pcDNA₃, utilizando los oligonucleótidos CG1526 y CG1527, obteniendo el constructo pcDNA₃-GDH, que permite la expresión de GDH de *S. aurata*.



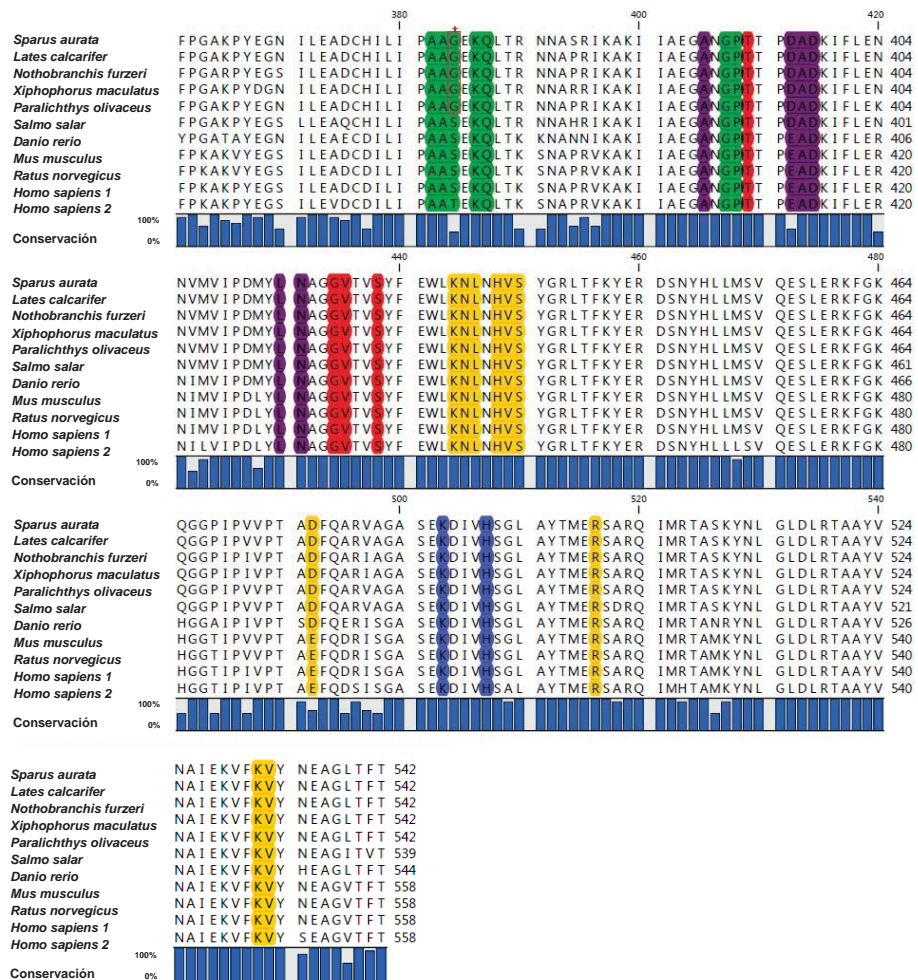


Figura 14. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de GDH de *S. aurata*.
 Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de GDH predicha para *S. aurata* y otras especies de *Percomorphaceae*, así como otros vertebrados. El alineamiento se realizó empleando el programa *CLC Sequence Viewer 7.8.1*. La barra azul representa el porcentaje de conservación del alineamiento. Los diferentes colores marcan los residuos de aminoácidos implicados en la unión de GTP (azul), NAD⁺ (verde), ADP (amarillo), glutamato (rojo) y el sitio de unión a tiamina pirofosfato (magenta). La secuencia aminoacídica incluye los residuos del péptido señal mitocondrial que se resaltan en gris oscuro. Las entradas del *GenBank* mostradas son: *Nothobranchis furzeri* (XP_015818399.1), *Xiphophorus maculatus* (XP_005794695.1), *Lates calcarifer* (XP_018531054.1), *Paralichthys olivaceus* (XP_019938702.1), *Salmo salar* (NP_001117108.1), *Danio rerio* (NP_997741), *Mus Musculus* (NP_032159.1), *Ratus norvegicus* (NP_036702.1), *Homo sapiens* GDH1 (NP_005262.1) y *Homo sapiens* GDH2 (NP_036216.1).

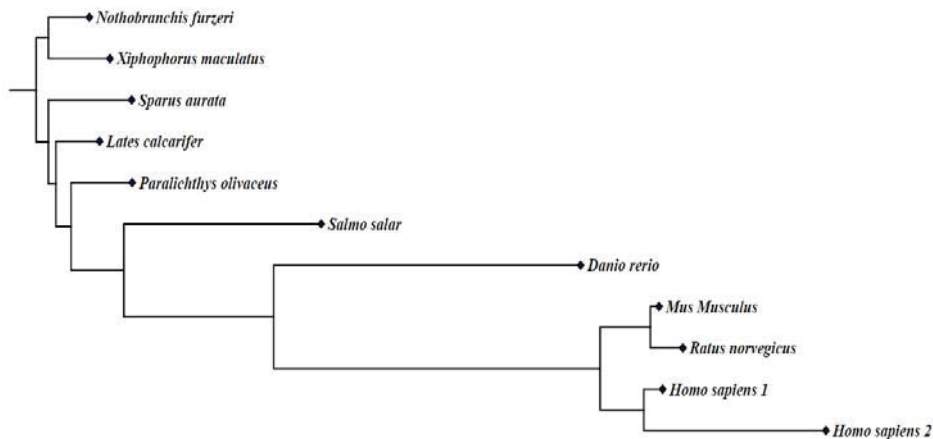


Figura 15. Diagrama filogenético de la secuencia aminoacídica de *S. aurata*.

Diagrama filogenético de GDH de *S. aurata* y otras secuencias reportadas para otros animales, va ser construido usando el programa *CLC Sequence Viewer 7.8.1*, basado en el alineamiento múltiple mostrada en la figura 2.

4.2 CLONACIÓN DEL PROMOTOR DE GDH DE *S. AURATA*

A fin de estudiar el control transcripcional de GDH, se clonó y caracterizó la región promotora del gen *gdh* de *S. aurata* mediante la técnica del paseo cromosómico (apartado 3.15), partiendo de ADN genómico y utilizando oligonucleótidos específicos para la GDH de dorada.

El primer paso fue la construcción de cuatro librerías genómicas por digestión del ADN genómico purificado de hígado de doradas con enzimas de restricción que producen extremos romos, como se describe en el apartado 3.16.1. Las librerías obtenidas se sometieron a dos rondas de PCR. Una PCR primaria se realizó utilizando los oligonucleótidos externos AP1 (suministrado por el *kit*) y CG1316 (oligonucleótido específico). A continuación, se realizó una PCR secundaria partiendo del producto de la PCR primaria diluida y utilizando como oligonucleótidos internos AP2 (suministrado por el *kit*) y CG1315 (oligonucleótido específico). Los oligonucleótidos CG1315 y CG1316 fueron diseñados en base a la secuencia de ADNc de GDH previamente descrita en el apartado 4.1.

El producto de amplificación de mayor tamaño, ~2.1 Kpb, se subclonó en el plásmido pGEM-T *Easy* para ser posteriormente secuenciado. El constructo obtenido, fue denominado pGEM-GDH2057. La secuencia nucleotídica, con un total de 2057 pb, fue sometida a la base de datos GenBank con el número de acceso MF459046 (Figura 4). Adicionalmente, la aplicación de la técnica 5' RLM RACE (Schaefer, 1995) nos permitió determinar el inicio de transcripción del mensajero que codifica GDH de *S. aurata*, que se sitúa 140 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio de traducción.

4.2.1 Caracterización del promotor de GDH de *S. aurata*

El análisis de la secuencia de 2057 pb adyacente al extremo 5' del ADNc que codifica para GDH de dorada mediante el programa informático *JASPAR* (Sandelin, 2004), indica la presencia de posibles lugares de unión para diferentes factores de transcripción, entre los cuales destacan: USF2, cMYB, CEBP, Jun:Fos y FoxO (Figura 16).

Para analizar la actividad transcripcional de la secuencia 2057 pb obtenida mediante paseo cromosómico, se subclonó dicha secuencia en el vector reportero pGL3-*Basic*, que carece de promotor propio para controlar la expresión de luciferasa. La utilización del plásmido pGL3-*Basic* nos permitió comprobar si la región de ADN genómico que flanquea al exón 1 contiene un promotor funcional.

Para examinar las regiones del promotor implicadas en la modulación de la expresión basal de GDH en dorada se realizaron deleciones del extremo 5' del fragmento del promotor, mediante la utilización de enzimas de restricción o amplificación por PCR. Los fragmentos delecionados en 5' desde la posición -1286 hasta la +19 respecto al inicio de transcripción (manteniendo en todos los casos +70 como extremo 3') fueron subclonados en el plásmido pGL3-*Basic*. Se obtuvo así los constructos pGDH1286 (de -1286 a +70), pGDH982 (de -982 a +70), pGDH413 (de -413 a +70), pGDH128 (de -128 a +70), pGDH85 (de -85 a +70) y pGDH+19 (de +19 a +70) (tal como indica en el apartado 3.3).

Los plásmidos recombinantes obtenidos, fueron cotransfectados transitoriamente en células HepG2 con el plásmido pCMV β , que expresa *lacZ* (β -galactosidasa), utilizada como control interno de la eficiencia de la transfección. Dieciséis horas después de la transfección, el análisis de la actividad luciferasa de los constructos reporteros que


```

-2016 CTGAGAGGAA GACTACTGCC CTC0000000 CATCTTTACA CAAACACACA TAAC0000CAG CTTTGTGTTATA GCTCTCTCTG AAATGCTTTC AAGTAAACCC
-1916 CCATTCACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAG AATGACCTCC TGCCCTAAAT TACACCTTCT CACTTGGACA CATAATTGTA
-1816 TGCTTTGCAC ACACATCTAC ACAAAACATG CATAAAAAGT AGGCTGTTG CCAGCACAAT GACATTCTA TTGCTTTTAT CAAGTACTGT ATCAGTACTA
-1716 GAATGCACCT CAGTAGAGTA CAGTTTCATT GAGATCATGC ATTACTGAAA ATGTTGAAAA ATGACCTTCC TTGCAATTTT AAAGAAAGTT TGATAAAATT
-1616 CCGTCCCTTT ATCTCGATCC ACACAAAAG TTTTGGGGT CTATTCTGGA TCGAGACCAA TCAACCATAC AAGTTTTTTA ACAATTCTTT CAGCAGTGT
-1516 TGTGTAATCA AGTTGACAAA CCAACCAACG GGTCACATTC TACTCGGCT GATAAGAAAA TCAGCTCTTA ATACAGATTG CTCCTTCAAG TTTCAAGTCA
-1416 AGTCAACAGT TGAAGGCCAA ACTGATTTTT GTCAACAAA ATCGGGAGTA AACAGTTAAT TCTTCAAAAT GCCAACATTC ATGTGAAGCC TGTAAAGAA
-1316 CTTTCATTTT TAGCCATGCT AGCAGCTAGC TAGGCTCAA TAATGACAGT ATCGTCTGTC AGTCCACCAC TTTGCTCCAG ACTGAAACAT CTCACAAAC
-1216 ATTGAAAGGA TTGCATAAAA CTTTGACATT CATGGTTCAT CCATTCATCC ATTCACATTAT CAAGTAAAAT ATCCAAACAT CTAACAGATG GATTGGCACA
-1116 ATGTGTGTA GAGACTCATG ATCATTTCAT TCTCATTCAG GATGAATTC AATAACTTTC ATGATCCCTT ACACATCCAG TTTTCAAGAA TTCCATTTT
-1016 GTCAAATACT GAAGCTTGGT TTGACTGCTG ATCCGACTTA CAATCACCAG AAGCGCCAGT ATCAAGACTC AAAACACAAAC TTCCTTACAA ATGGGACCTT
-916 TGACTTTTAA TCTAGTCCCA TTATAAGTGC TCAGTTCATC CCATACCTTG GTTTATGACC AAATACTTGC AAACTTATT CCCATRAAGC TCAGTCTGAC
-816 ATTGTGTTTG GAGCACATAG CGAATGTAA CATGCTAACA CGCTAATATG GTGAATAAGG TACATGTTAG CATGCTGTGT AAGCCTCAGA ACAGCCTCAC
-716 AGAGCTCCTG GCTTAATCAT AGGTTTAAAA AAAAAAGTT TTAAGTCAAT ATGGATATTT TTTAATGCCA GTGTTCAATG GTCAGTTATA TGTGCTGGAA
-616 TACAGAAACT ACAGCTACTT CAACAACAGA TCAACCCCTT CATTAACTGT AGCTGTCCAT GAGGACGTT AATGACTGAT GCAAACACAA AGGGCCTTTT
-516 CAGCAGCTCC CATCTCCTC CTCTCTCTC TCTCTCTCT TCCCTCATG GCTGTGTGCA CTCACTCAAC AGATCGGGGA ACTGCTGATG ACAGCATGCC
-416 TCATATGAGC AAACGACAAA GTACAAACTT GTAACACTGT GGACGCGGTA CAAAAGATAA TGAATAACA AGCCGATGCT CGTCATATCT GCCAGCTTAT
-316 GCTTCTACAA ACTTAATAAA ATAAATATAT CTACTATAGC ATTCAATTCT AGTTAGTGGC TCGAATTCAT CTCAACATAT TTTACGCAAT CCTATGAAA
-216 TAAATCATTT TATATCATTT AACTTTCCCT TTTCTTACT TTTTCCCTC CATCTTTGAA AACCAACGGT GGGAACTCGG GAGCGCGCGG TGTCAAGTTGG
-116 ACAGCAACGG CGCGCGCTC CTTGGTCTT CCTCTCCGCT GTGAGTCCCG AGGAACCCCG ACTGCTCTCC CGGGCTCGTG CTGGCTTTTA AAGCAAACCTG
-16 ACAAGCATG TCATTCCCA CTCGGCCAGA GGACGGGACA CGGTGAGGAG CTGCTGTgtc gttcattcta cccccctctt cctgtgtcga cccccattgt
+85 cettgttgtt tagttgcttt ttattagttc gtttacacgg ttagetagt tttagtcatg

```

Figura 16. Fragmento adyacente de la secuencia nucleotídica del extremo 5' del gen *gdh*.

Las letras mayúsculas indican la región clonada utilizando la técnica de paseo cromosómico. Las letras minúsculas corresponden al ADNc previamente clonado como indica en el apartado 4.1. El inicio de la transcripción se indica con una flecha. En negrita se señala el codón de inicio de la traducción. En rectángulos se indican los posibles lugares de unión de factores de transcripción según el análisis con el programa *JASPAR*.

contienen los fragmentos del promotor de -1286 a -85 pb presentaron una activación transcripcional de 25 a 45 veces (figura 17) respecto al control negativo pGL3-*Basic*. Por el contrario, la transfección con el constructo más pequeño (pGDH+19) promovió una marcada disminución de la actividad promotora. Estos resultados sugieren que la región correspondiente a los 1286 nucleótidos corriente arriba del extremo 5' respecto al inicio de la transcripción de GDH de dorada contiene un promotor funcional, y que la región promotora situada entre -85 pb y +19 pb podría contener elementos reguladores en *cis* esenciales para la transcripción basal del gen que codifica para GDH de dorada.

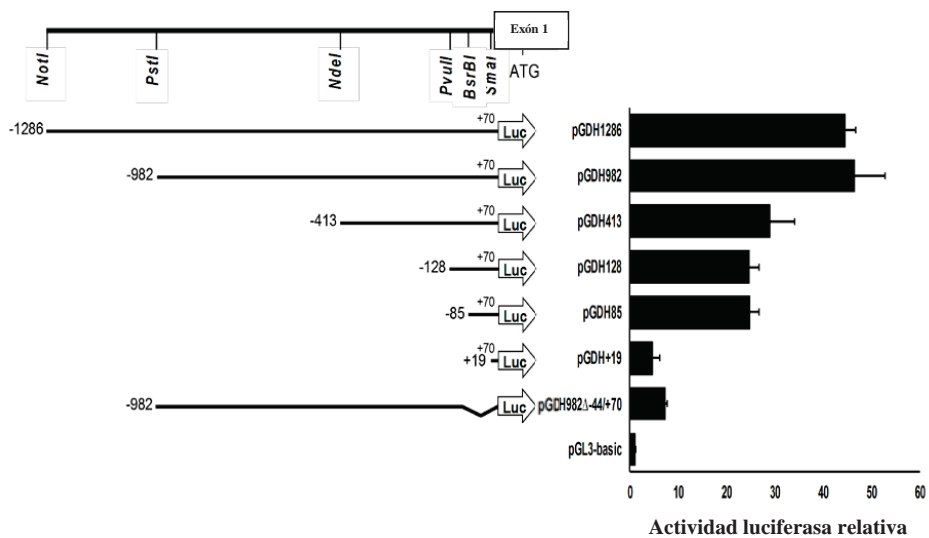


Figura 17. Estudio de la actividad basal del promotor GDH en células HepG2

En la parte izquierda de la figura se representa la región adyacente al extremo 5' del gen que codifica para GDH de dorada. En la barra superior están indicados algunos lugares de restricción y el inicio de la transcripción. La numeración nucleotídica se inicia desde +1, que corresponde al inicio de la transcripción. Los constructos reporteros, con diferentes extremos 5' pero extremos 3' idénticos (+70), fueron utilizados para transfectar células HepG2. Las células fueron transfectadas en placas de 6 pocillos con 2 µg de los constructos reporteros y 0,25 µg de pCMVβ. La actividad luciferasa es expresada como veces de inducción en relación a la actividad observada al transfectar con el plásmido reportero pGL3-*Basic* sin el promotor, valor que se va referenciar en 1. Los resultados representan el valor medio de la actividad luciferasa ± DE de al menos tres experimentos realizados por duplicado.

4.7 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE GDH POR USF2

4.7.1 Activación del promotor de GDH por USF2

El análisis *in silico* de la secuencia del promotor GDH de dorada nos permitió localizar un posible lugar de unión para USF2 (*E-box*), entre las posiciones -10 y -5 en relación al inicio de la transcripción (figura 16). Con el fin de conocer la implicación de este factor en la transcripción de GDH se realizaron ensayos de cotransfección transitoria en células HepG2. Se utilizaron los constructos reporteros que presentaban diferentes deleciones en el extremo 5' del fragmento del promotor clonado, juntamente con un plásmido de expresión que codifica para USF2 humano.

Cuando los fragmentos de cotransfección incluían los constructos que contienen un fragmento del promotor con 85 pb corriente arriba del inicio de transcripción o superior (pGDH85, pGDH128, pGDH413, pGDH982) y el plásmido que codifica USF2, se observó un incremento de la actividad promotora de 4 a 5 veces respecto a la transfección en ausencia del plásmido de expresión para USF2. Por el contrario, al cotransfectar las células con el plásmido pGDH+19, no se observó actividad transactivadora por USF2 (Figura 18).

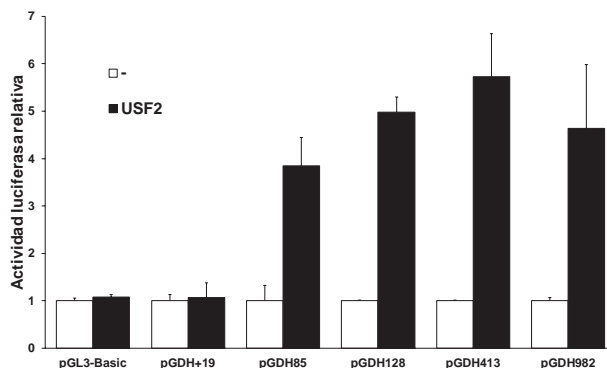


Figura 18. Efecto de USF2 sobre la transcripción del promotor GDH de *S. aurata*

Se transfectaron células HepG2 en placas de 6 pocillos con 2 μg de los constructos reporteros pGDH+19, pGDH85, pGDH128, pGDH413, pGDH982 o pGL3-Basic, 0,25 μg de pCMV β y en presencia o ausencia de 0,2 μg del plásmido de expresión que codifica para USF2. La actividad luciferasa se expresa como veces de inducción en relación a la actividad observada con el constructo correspondiente en ausencia de factor de transcripción, valor que se referencia en 1. Los resultados representan el valor medio del incremento de la actividad luciferasa \pm DE correspondiente a cuatro experimentos realizados por duplicado.

El hecho de que el constructo de menor tamaño transactivado por USF2 sea pGDH85 y la presencia de un elemento *E-box* situado en los nucleótidos -10 a -5, sugieren que la unión de USF2 a dicho elemento *E-box* podría ser responsable de la activación de la transcripción del promotor GDH por USF2. Para confirmar si este *E-box* tiene un papel en la activación de GDH por USF2, se diseñó un constructo con una delección de los nucleótidos -44 a +70 (pGDH982Δ-44/+70). Este constructo, al ser cotransfectado en células HepG2 conjuntamente con USF2, no mostró incremento de la actividad promotora (figura 19), confirmando que la región -44 a +70 está implicada en la transactivación por USF2.

También se evaluó si la isoforma USF2b promueve el mismo efecto que USF2 (también denominado USF2a) sobre el promotor de GDH. Como se puede observar en la figura 19, USF2 y USF2b muestran el mismo comportamiento al transactivar el gen reportero de luciferasa.

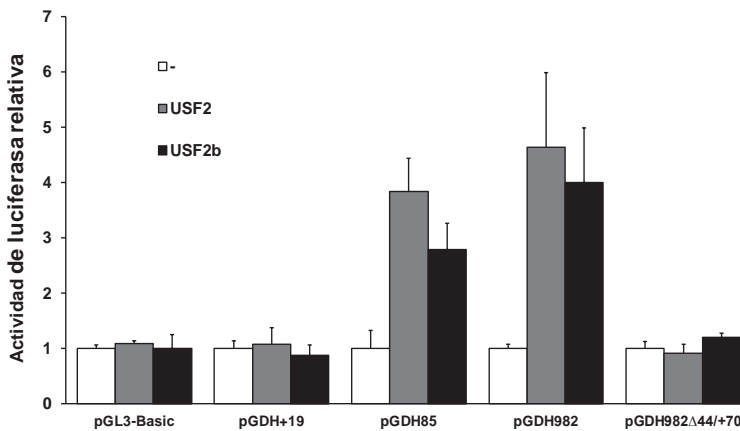


Figura 19. Efecto de USF2 y USF2b sobre la transcripción del promotor GDH de *S. aurata*

Se transfectaron células HepG2 en placas de 6 pocillos con 2 μg de los constructos reporteros pGDH+19, pGDH85, pGDH982, pGDH982Δ44/+70 o pGL3-Basic, 0,25 μg de pCMV β y en presencia o ausencia de 0,2 μg del plásmido de expresión que codifica para USF2. La actividad luciferasa se expresa como veces de inducción en relación a la actividad observada con el constructo correspondiente en ausencia de factor de transcripción, valor que se referencia en 1. Los resultados representan el valor medio del incremento de la actividad luciferasa \pm DE correspondiente a cuatro experimentos realizados por duplicado.

4.4.2 USF2 se une al *E-box* en la posición -10 a -5

Con el fin de analizar si USF2 puede unirse al elemento *E-box* presente en la posición -10 a -5 respecto al inicio de transcripción, se realizaron ensayos de cambio de movilidad

electroforética en gel (apartado 3.20). Para tal fin se utilizaron extractos nucleares de células HepG2 sobreexpresando USF2 y una sonda que contiene los nucleótidos entre la posición -22 a +9 en relación al inicio de la transcripción del promotor GDH de dorada. Esta secuencia nucleotídica contiene el hipotético lugar de unión a USF2 situada entre -10 a -5 (figura 16). Los experimentos de cambio de movilidad electroforética en gel revelaron la formación de un complejo ADN-proteína con movilidad retardada (carril 6 de la figura 20). Como control positivo se utilizó una sonda que contiene la secuencia *consensus* de unión a USF2 (USF2-cons), que dio lugar a una banda de la misma movilidad (carril 2 de la figura 20).

Al efectuar experimentos de competición con un exceso molar de 200 y 1000 veces de sonda USF2-cons no marcada (carriles 3-4 y 7-8), la banda con movilidad retardada disminuye en intensidad respecto a la que se muestra en ausencia de sonda USF2-cons no marcada (carriles 2 y 6). Los ensayos de cambio de movilidad electroforética efectuados utilizando extractos nucleares de células HepG2 sobreexpresando USF2 y una sonda mutada en la región *E-box*, GDH-22/+9mutUSF, muestran la total desaparición de la banda retardada observada cuando se utiliza las sondas USF2-cons y el oligonucleótido de doble cadena GDH22/+9 (carril 10).

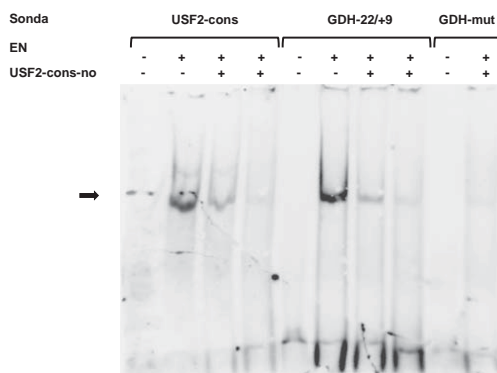


Figura 20. Ensayo de cambio de movilidad electroforética en gel

El ensayo de cambio de movilidad electroforética en gel se ha realizado utilizando extractos nucleares (EN) hepáticos de células HepG2 sobreexpresando USF2 y las sondas marcadas USF2-cons (carril 1-4), GDH-22/+9 (carril 5-8) o GDH-22/+9mutUSF (GDH-mut) (carril 9-10). Las muestras aplicadas en el carril 1 y 5 corresponde a ensayos efectuados en ausencia de EN. En los carriles 2 y 6 se observa una banda retardada, correspondiente a la unión en presencia de extractos nucleares y oligonucleótidos marcados (USF2-cons, GDH-22/+9), y en ausencia de competidor. Los carriles 3 a 4 y 7 a 8 muestra los estudios de competición realizados con 200 y 1000 veces respectivamente, de exceso molar de oligonucleótido de doble cadena USF2-cons no marcado (USF2-cons-no). Los oligonucleótidos utilizados se describen en el apartado 3.3.1.

4.4.3 Mutaciones en el elemento *E-box* eliminan la transactivación producida por USF2

A fin de caracterizar el efecto que produce mutar el *E-box* localizado en la posición -10 a -5 sobre la actividad promotora de GDH, se ha obtenido el constructo pGDH982mutUSF2. Este constructo contiene el fragmento de 982 pb (-982 a +70 en relación al origen de transcripción de GDH) con las mismas mutaciones que presenta el oligonucleótido de doble cadena GDH-22/+9mutUSF, que se utilizó en los ensayos de cambio de movilidad electroforética. Se realizaron experimentos de cotransfección en células HepG2 utilizando los constructos pGDH982, pGDH85, pGDH+19 y pGDH982mutUSF2 en presencia y ausencia del vector de expresión para USF2. Tal como se muestra en la figura 21, USF2 no es capaz de promover la activación transcripcional cuando el lugar *E-box* está mutado.

Estos resultados indican que el lugar *E-box* situado entre -10 a -5 en relación al inicio de la transcripción del promotor GDH de dorada, es el responsable de la transactivación inducida por USF2.

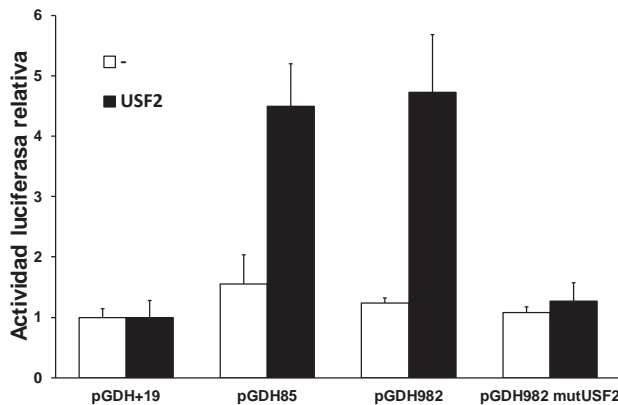


Figura 21. Efecto de USF2 sobre la actividad promotora GDH con el *E-box* mutado.

Células HepG2 fueron cotransfectadas con los constructos pGDH+19, pGDH85, pGDH982 o pGDH982mutUSF2 a la concentración de 2 μg conjuntamente con 0,25 μg de pCMV β y en presencia o ausencia de 0,2 μg del vector de expresión que codifica para USF2. La actividad luciferasa se expresa como veces de inducción de la actividad obtenida con el constructo reportero en ausencia del factor de transfección, valor que se estableció en 1. Los datos representan la media \pm DE de los valores observados en dos experimentos independientes efectuados por duplicado.

4.5 DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LA EXPRESIÓN GDH Y USF2 EN *S. aurata*

A partir de ARN total aislado de doradas alimentadas, y mediante la técnica de RT-qPCR, se ha determinado la distribución tisular de la expresión de GDH y USF2. La GDH es una enzima implicada en la desaminación de aminoácidos, mientras que los experimentos de transfección transitoria en células HepG2 y de movilidad retardada muestran que USF2 un factor de transcripción que regula la actividad del promotor GDH. Los tejidos donde se analizó la expresión de GDH y USF2 fueron: bazo, branquias, cerebro, corazón, grasa, hígado, intestino, músculo esquelético y riñón.

La GDH se expresa mayoritariamente en el hígado, seguida por intestino, corazón y riñón. La expresión de GDH en el hígado es 25 veces superior a la de los tejidos en donde se observa menor expresión, como bazo, branquia y grasa (Figura 22). En cuanto a USF2, la expresión es ubicua, aunque se observa una mayor expresión de ARNm en el cerebro y bazo, seguido por el corazón, branquia, riñón e hígado.

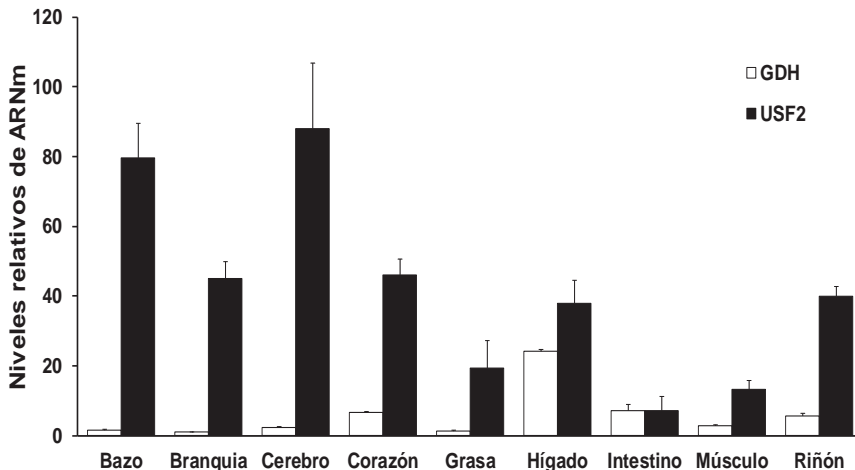


Figura 22. Análisis por RT-PCR de la expresión de GDH y USF2 en diferentes tejidos de *S. aurata*. ARN total extraído de bazo, branquia, cerebro, corazón, grasa, hígado, intestino, músculo esquelético y riñón de doradas alimentadas fue sometido a transcripción inversa y posterior análisis por RT-qPCR. Los niveles de ARNm de GDH (oligonucleótidos CG1543 y CG1544) y de USF2 (oligonucleótidos CG1557 y CG1558) fueron normalizados con la media geométrica de los niveles de ARNm de *elongation factor-1 α* (EF-1 α), beta-actina (β -actina) y la subunidad ribosomal 18 s. Los datos son expresados como la media \pm DE correspondiente a 2 pools de tejidos correspondientes de 4 a 5 peces cada uno, en valores obtenidos a partir de 2 experimentos independientes.

4.6 REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA EXPRESIÓN DE GDH Y USF2 EN HÍGADO DE *S. AURATA*

Habiendo demostrado que USF2 puede unirse y transactivar el promotor GDH en el hígado de dorada, se evaluó el rol que podría ejercer USF2 en la regulación nutricional de la transcripción hepática de GDH en *S. aurata*. Para tal fin, los niveles de ARNm de GDH y USF2 fueron determinados por RT-qPCR en muestras de hígados de peces sometidos a ayuno-realimentación y alimentados con diferentes tipos de dietas.

4.6.1 Efecto del ayuno y la realimentación sobre la expresión de GDH y USF2

Para estudiar efecto del ayuno y la realimentación sobre la expresión de ARNm de GDH y USF2 mediante RT-qPCR, se analizaron las muestras de hígado de peces alimentados 18 días, peces ayunados 19 días, y peces realimentados durante 6 horas, 24 horas, 5 días y 14 días. El cambio en el estado nutricional de los peces afectó similarmente a la expresión de ARNm de GDH y USF2. En los hígados de doradas sometidas a ayuno durante 19 días, los niveles de ARNm de GDH y USF2 experimentaron una disminución de 1,7 veces respecto al grupo de peces alimentados. Seis horas después de la realimentación de los peces, los niveles de ARNm para ambos genes son similares e incluso con tendencia a ser inferiores a los observados en situación de ayuno. Los niveles de ARNm de GDH y USF2 fueron recuperando gradualmente hasta alcanzar una expresión similar a los peces alimentados después de 14 días de realimentación (figura 23). Los ensayos de RT-qPCR muestran que la expresión de GDH y USF2 es modulada de manera prácticamente equivalente en respuesta al ayuno y realimentación.

4.6.2 Efecto de la composición de la dieta sobre la expresión de GDH y USF2

Para comprender el efecto de la composición de la dieta sobre la expresión de GDH y USF2 se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de ARNm para ambos genes en hígado de peces alimentados con las dietas HLL (alta en proteína, baja en lípidos y carbohidratos), LLH (baja en proteína y lípidos y alta en carbohidratos) y MHL (media en proteína, alta en lípidos y baja en carbohidratos). La composición de las dietas LLH y MHL afectan de manera similar a la expresión de ARNm de GDH y USF2. Los peces alimentados con la dieta HLL muestran un incremento en los niveles de expresión de GDH de 2.2 veces respecto al grupo de peces alimentados con las dietas LLH y MHL.

Sin embargo, la expresión de USF2 no presentó cambios significativos en función de la composición de la dieta (figura 24).

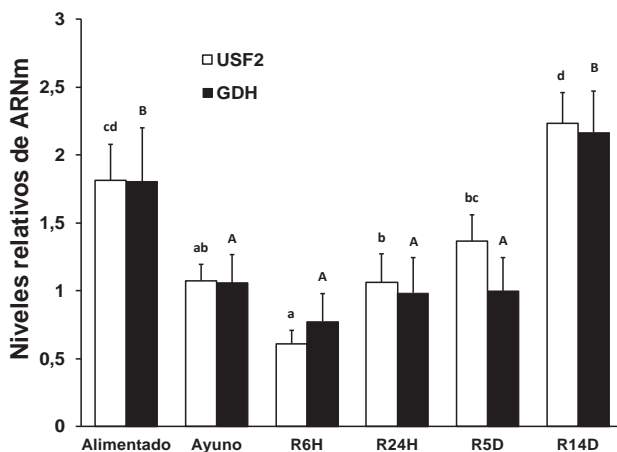


Figura 23. Efecto del ayuno y la realimentación en la expresión de GDH y USF2.

Análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de GDH y USF2 en hígado de doradas alimentadas, sometidas a un ayuno de 19 días y realimentadas a las 6 horas, 24 horas, 5 días y 14 días. Los niveles relativos de ARNm de GDH y USF2 fueron normalizados con la media geométrica de los niveles de ARNm de *elongation factor-1α* (EF-1α), beta-actina (β-actina) y la subunidad ribosomal 18 s. Los datos se expresan como la media ± DE correspondiente a 6 peces. Diferentes letras ^{A,B,a,b,c} indican diferencias significativas entre condiciones ($P < 0,05$).

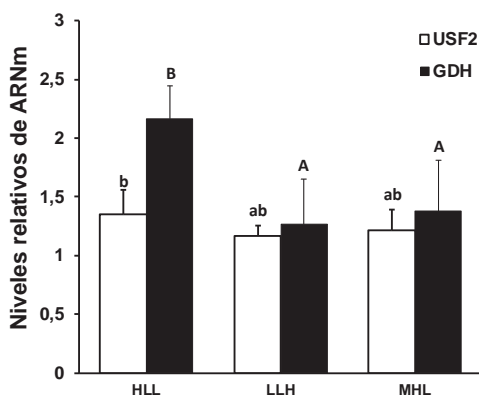


Figura 24. Efecto de la composición de la dieta en la expresión de GDH y USF2.

Análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de GDH y USF2 en hígado de doradas alimentadas con las dietas HLL, LLH y MHL. Los niveles relativos de ARNm de GDH y USF2 fueron normalizados con la media geométrica de los niveles de ARNm de *elongation factor-1α* (EF-1α), beta-actina (β-actina) y la subunidad ribosomal 18 s. Los datos se expresan como la media ± DE correspondiente a 6 peces. Diferentes letras ^{A,B,a,b} indican diferencias significativas entre condiciones ($P < 0,05$).

4.7 PAPEL DE MYB EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GDH

4.7.1 Presencia de lugares putativos de unión de MYB al promotor del gen GDH de *S. aurata*

El análisis *in silico* de la secuencia del promotor GDH de dorada con el programa bioinformático JASPAR nos ha permitido identificar, adicionalmente al lugar de unión a USF2, varios posibles sitios de unión de MYB (*MYB binding site*; MBS) en el promotor GDH, tal y como se indica en la Tabla 3.

El análisis *in silico* fue realizado con la región del promotor que corresponde desde la posición -982 a la +70 con respecto al inicio de la transcripción, con un umbral mínimo de puntuación relativa de unión del MYB a la caja MBS del 80%.

Tabla 3. Posibles sitios de unión de MYB al promotor GDH de *S. aurata*.

FT	Score relativo	Inicio	Final	Hebra	Secuencia
Myb	0.8272	-941	-932	1	ACAACTTCCT
Myb	0.8002	-916	-907	-1	TAAAAAGTCA
Myb	0.8364	-651	-642	-1	AACACTGCCA
Myb	0.8162	-642	-633	1	TCAATAGTCA
Myb	0.9091	-637	-628	-1	ATAACTGACT
Myb	0.8019	-574	-565	1	TTAACTGTAG
Myb	0.8240	-568	-559	1	GTAGCTGTCC
Myb	0.8954	-554	-545	-1	TTAACTGTCC
Myb	0.8055	-544	-535	-1	GCAATCAGTCA
Myb	0.8104	-514	-505	1	GCACTCCCA
Myb	0.8094	-428	-419	-1	CATGCTGTCA
Myb	0.8446	-332	-323	1	ATATCTGCCA
Myb	0.8452	-327	-318	-1	TAACTGGCA
Myb	0.9765	-126	-117	-1	CAAAGTACA
Myb	0.9605	-23	-14	1	CAAAGTACA

*Umbral mínimo de puntuación relativa al 80%

Hemos detectado posibles lugares de unión de MYB, con un *score* relativo mayor a 0,90 entre las posiciones -23 a -14, -126 a -117 y -637 a -628 en relación al inicio de la transcripción. Con el fin de comprobar la implicación de MYB en la transcripción de GDH se realizaron ensayos de cotransfección transitoria en células HepG2, utilizando constructos reporteros que presentan diferentes deleciones en el extremo 5' del fragmento del promotor clonado, juntamente con el plásmido de expresión que codifica para cMYB humano.

4.7.2 Activación del promotor de GDH por cMYB

Como se muestra en la figura 25, los ensayos de cotransfección transitoria de células HepG2 con plásmidos reporteros con fragmentos delecionados del promotor de GDH de dorada y un plásmido de expresión de cMYB mostraron un incremento de la actividad promotora de 4 a 6 veces en los constructos pGDH413, pGDH648 y pGDH982 respecto a la transfección en ausencia del plásmido de expresión de cMYB. Así mismo los constructos pGDH85 y pGDH128 mostraron un incremento de la actividad promotora de mas 2 veces. Por el contrario, al cotransfectar las células con el plásmido pGDH+19, no se observó actividad promotora mediada por cMYB.

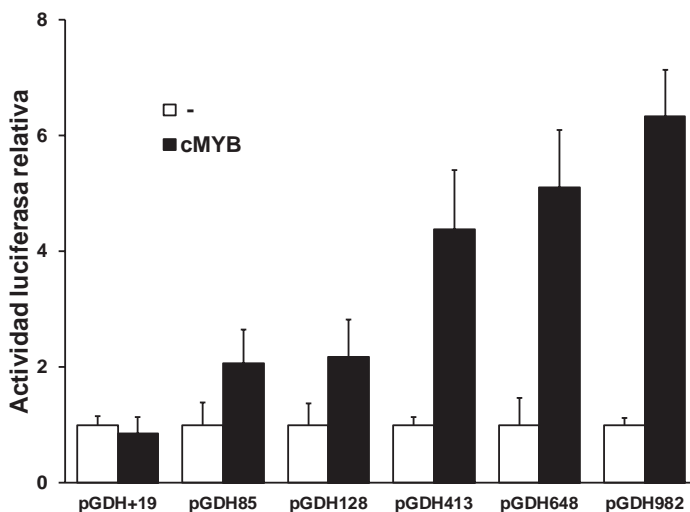


Figura 25. Efecto de cMYB sobre la transcripción del promotor GDH de *S. aurata*

Se transfectaron células HepG2 con 2 μg de los constructos pGDH+19, pGDH85, pGDH128, pGDH413, pGDH648 o pGDH982, 0,25 μg de pCMV β y en presencia o ausencia de 0,2 μg del plásmido que codifica cMYB. La actividad luciferasa se expresa como veces de inducción en relación a la actividad observada con el constructo correspondiente en ausencia de factor de transcripción, valor que se referencia en 1. Los resultados representan el valor medio del incremento de la actividad luciferasa \pm DE correspondiente a 4 experimentos realizados por duplicado.

El hecho de que los constructos pGDH982, pGDH648, pGDH413, pGDH128, pGDH85 responden a diferentes niveles de activación del promotor GDH a cMYB, sugiere la posibilidad de que haya más de un sitio de unión a MYB.

De hecho, como se muestra en la tabla 3, hay varios sitios teóricos posibles de unión a cMYB. Los posibles lugares de unión de MYB con mayor *score* relativo se encuentran entre las posiciones -126 a -117 y -637 a -628 en relación al inicio de la transcripción. Así mismo, los constructos que contienen estas dos regiones presentan mayor actividad, como se muestra en la figura 25. Con el fin de verificar si estos posibles lugares de unión tienen un papel en la activación del promotor GDH por cMYB, se diseñaron constructos con deleciones en los nucleótidos -44 a -278 (pGDH982 Δ -278/-44), -278 a -413 (pGDH982 Δ -413/-278) y -413 a -709 (pGDH982 Δ -709/-413).

El constructo delecionado pGDH982 Δ -709/-413 al ser cotransfectado en células HepG2 conjuntamente con un plásmido de expresión de cMYB, no mostró un incremento de la actividad promotora. La deleción -44 a -278 promovió un descenso de un 55% de la actividad promotora observado con el constructo pGDH982, y el constructo delecionado pGDH982 Δ -413/-278 mantuvo la activación del promotor por cMYB. Estos resultados son consistentes con la presencia de al menos dos lugares unión para cMYB en el promotor. (Figura 26).

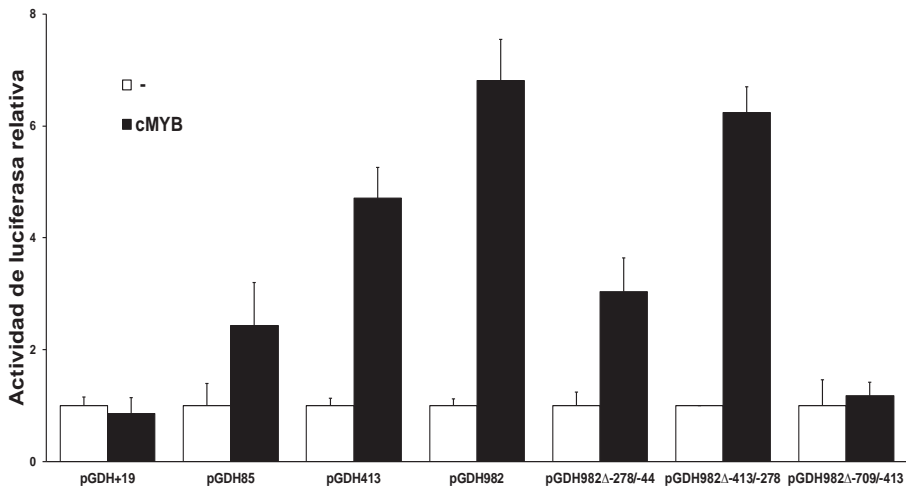


Figura 26. Efecto de cMYB sobre la transcripción del promotor GDH de *S. aurata*

Se transfectaron células HepG2 con 2 μ g de los constructos pGDH+19, pGDH982 pGDH982 Δ -278/-44 pGDH982 Δ -413/-278 o pGDH982 Δ -709/-413, 0,25 μ g de pCMV β y en presencia o ausencia de 0,2 μ g del plásmido que codifica cMYB. La actividad luciferasa se expresa como veces de inducción en relación a la actividad observada con el constructo correspondiente en ausencia de factor de transcripción, valor que se referencia en 1. Los resultados representan el valor medio del incremento de la actividad luciferasa \pm DE correspondiente a 4 experimentos realizados por duplicado.

4.8 SILENCIACIÓN GÉNICA DE GDH EN HÍGADO DE *S. AURATA*

Teniendo en cuenta que GDH desempeña un papel fundamental en el metabolismo de los aminoácidos para obtener energía y proveer sustratos gluconeogénicos, y habiendo demostrado que el nivel de la expresión del ARNm de GDH es regulado transcripcionalmente por el estado nutricional, nos planteamos avanzar en el conocimiento de la función de GDH en *S. aurata*, así como sus efectos metabólicos, mediante el rol que podría ejercer una silenciación de la expresión del ARNm que codifica para la enzima GDH de hígado de *S. aurata* utilizando sh-ARNs.

4.8.2 Silenciamiento de la expresión de GDH de *S. aurata* mediante shARN *in vitro*

La transfección de células HepG2 con el plásmido que expresa GDH de *S. aurata* nos permitió validar *in vitro* diferentes sh-ARNs diseñados para promover la silenciación de la expresión de GDH en posteriores estudios *in vivo*. Previo a la introducción de material genético en doradas, el primer objetivo fue el diseño de los sh-ARNs.

Para identificar secuencias potenciales de sh-ARN que ejerzan efecto silenciador de la expresión de GDH, se diseñaron 5 sh-ARNs (SH1-SH5) utilizando los algoritmos del programa *siRNA Wizard software* de InvivoGen (apartado 3.3.2). Una vez diseñados los sh-ARNs contra GDH, se subclonaron en el vector pCpG-siRNA, obteniendo los constructos pCpG-SHX-GDH (X: 1-5), y se procedió a validarlos *in vitro*.

Para ello se realizaron transfecciones transitorias en células HepG2, con 600 ng del plásmido de expresión del sh-ARN específico para silenciar GDH (pCpG-SHX-GDH) o pCpG-siRNA-*scramble* (como control negativo), conjuntamente con 30 o 300 ng de un plásmido de expresión de GDH de *S. aurata* (pcDNA3-GDH; descrito en el apartado 4.1) y 300 ng de pCMV β (*lacZ*) para normalizar los resultados en función de la eficiencia de transfección. A las 48 horas post-tratamiento se cuantificó el efecto del silenciamiento de los diferentes sh-ARN determinando los niveles de ARNm de GDH mediante RT-qPCR utilizando ARN total aislado de las células transfectadas.

El sh-ARN SH2 fue el que mostró un mayor efecto inhibitor significativo en la expresión de GDH, disminuyendo los niveles de ARNm hasta un 80% de los valores

expresados observados en células transfectadas con 30 ng de pcDNA3-GDH en ausencia de sh-ARN, y un decremento del 55% con respecto a los valores expresados en células transfectadas con 300 ng de pcDNA3-GDH en ausencia de sh-ARN. Aunque en menor grado que SH2, SH4 y SH5 promovieron una disminución en la expresión de GDH en células HepG2 transfectadas con 30 ng de pcDNA3-GDH. Con una concentración mayor de pcDNA3-GDH no se observaron cambios significativos promovidos por SH4 y SH5. Los otros sh-ARN analizados, SH1 y SH3, no afectaron los niveles de expresión de ARNm de GDH (figura 27).

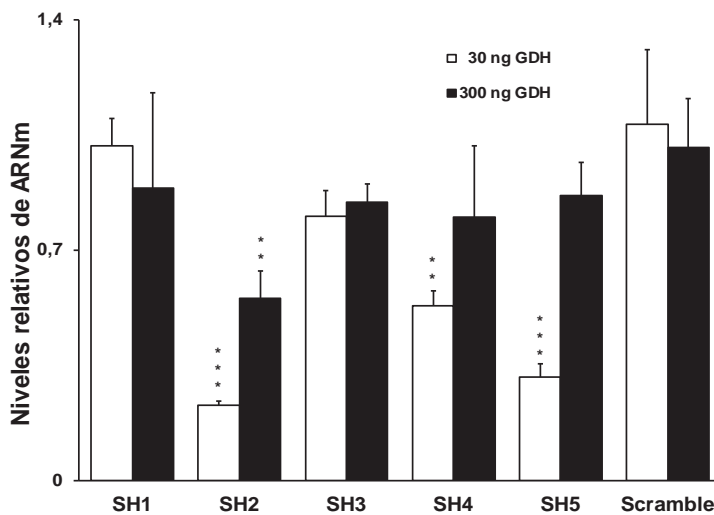


Figura 27. Silenciamiento génico de GDH de dorada expresada en células HepG2

Células HepG2 fueron cotransfectadas, en placas de 6 pocillos, con 300 ng del plásmido reportero pCMV β , 30 ng o 300 ng de pcDNA3-GDH y 600 ng de pCpG-SHX-GDH o pCpG-siRNA-*scramble* mediante la técnica de fosfato cálcico (apartado 3.24). 48 horas post-tratamiento se aisló el ARN total. La expresión de GDH se determinó mediante RT-qPCR utilizando los oligonucleótidos CG1543 y CG1544. Se utilizaron también oligonucleótidos específicos para la subunidad ribosomal 18s de humano (MC109 y MC110), utilizada como gen control de expresión constitutiva, y β -galactosidasa (JDRTp β mbS y JDRTp β mbAS), como control interno de transfección. Se muestran los niveles relativos de ARNm de GDH normalizados con β -galactosidasa y 18s. Los valores correspondientes a los controles se ajustaron a 1. Los resultados corresponden a los valores \pm DE de al menos 4 ensayos independientes realizado por duplicado. La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0,05$ (*); $P < 0,01$ (**); $P < 0,001$ (***) para la prueba *t-Student*.

4.8.2 Silenciamiento de la expresión de GDH en hígado de *S. aurata* mediante sh-ARN

Tras comprobar que el sh-ARN SH2, expresado por el constructo pCpG-SH2-GDH, permite silenciar la expresión de GDH de *S. aurata* en células HepG2 transfectadas con pcDNA3-GDH (apartado 4.8.1), se analizó el efecto metabólico del silenciamiento *in vivo* de GDH en hígado de *S. aurata*. Para ello, los peces fueron inyectados intraperitonealmente con nanopartículas formadas por pCpG-SH2-GDH o pCpG-siRNA-*scramble* (control negativo) encapsulados con quitosán-TPP, tal como se describe en el apartado 3.38.

Mediante microscopia de fuerza atómica se comprobó que la morfología de las nanopartículas obtenidas era redondeada (Figura 28) y que el tamaño medio de las nanopartículas fue de $224 \pm 62,3$ nm, con un potencial Z promedio de $32,98 \pm 1,16$ mV (Tabla 4; n=6)

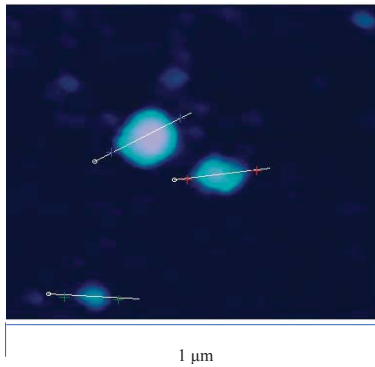
Tabla 4. Tamaño de partícula y potencial Z

Diámetro medio (nm)	Potencial Z (mV)
190	32,5
326	31,9
163	35,2
248	33
169	33
248	32,3
Media = 224,0	Media = 32,98
DE = 62,3	DE = 1,16

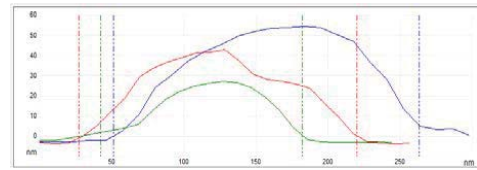
Las nanopartículas liofilizadas fueron reconstituidas en solución salina a una concentración de 1 mg ADN/mL 30 minutos antes de ser administradas. Por vía intraperitoneal, se administraron 10 µg de ADN plásmidico por cada gramo de pez a doradas juveniles alimentadas. Después de 72 horas del tratamiento, los peces fueron sacrificados y se colectaron muestras de sangre e hígado. La última ingesta fue 24 horas antes del sacrificio.

Para verificar el cambio de la expresión del ARNm de GDH en hígado de *S. aurata* tratadas con el complejo pCpG-SH2-GDH-quitosán-TPP, se aisló el ARN total de hígado. Mediante RT-qPCR se evaluó la expresión génica de GDH a nivel de ARNm en el hígado de los peces tratados con el complejo pCpG-SH2-GDH-quitosán-TPP (SH2) en relación a los peces control, tratados con el complejo pCpG-siRNA-*scramble*-quitosán-TPP (*scramble*) y los peces tratados con nanopartículas de quitosán-TPP sin encapsulamiento de ADN plásmidico (quitosán).

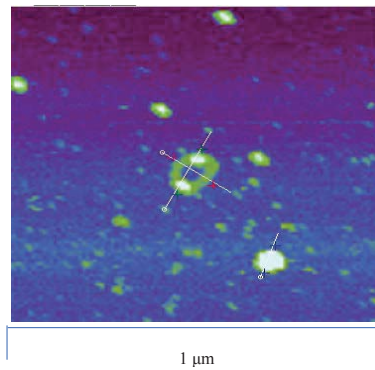
A.



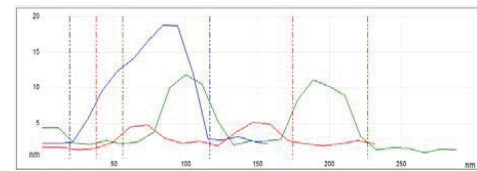
a.



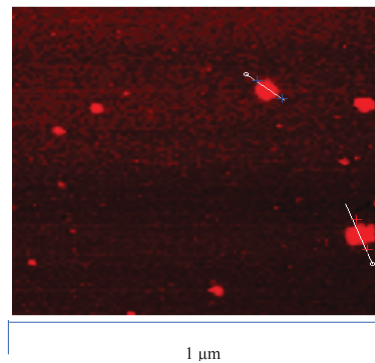
B.



b.



C.



c.

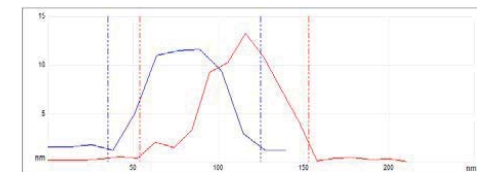


Figura 28. Caracterización morfológica de las nanopartículas de quitosán-TPP mediante microscopía de fuerza atómica.

A. Nanopartículas de quitosán-TPP sin encapsulamiento de ADN plásmico; **B.** Nanopartículas de quitosán-TPP con encapsulamiento de pCpG-siRNA-*scramble*; y **C.** Nanopartículas de quitosán-TPP con encapsulamiento de pCpG-sh2-GDH. Los paneles **A**, **B** y **C** muestran las imágenes de las nanopartículas y la representación del perfil de las medidas de las nanopartículas en el plano X/Y. Las nanopartículas de quitosán-TPP-DNA fueron analizadas mediante microscopía de fuerza atómica (Multimode 8 AFM unido a *Nanoscope III*). Para los 3 casos, se muestra una imagen representativa de 6 ensayos independientes. Barra de escala de 1 μ m.

Como se observa en la figura 29, el análisis de la expresión de GDH mediante RT-qPCR mostró una diferencia significativa en los niveles de ARNm de GDH en el hígado de los peces tratados con SH2. La expresión descendió hasta un 60% con respecto a los valores observados en los peces tratados con *scramble* y quitosán, que son referenciados como controles.

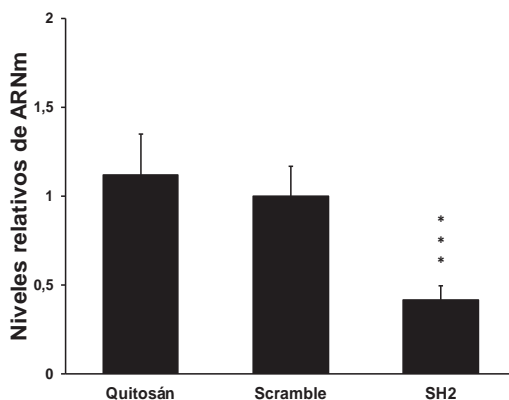


Figura 29. Silenciamiento génico de GDH en hígado de *S. aurata* mediante sh-ARN

Se administraron intraperitonealmente 10 μ g ADN plasmídico/gr de pez de los complejos pCpG-SH2-GDH-quitosán-TPP (SH2), pCpG-siRNA-*scramble*-quitosán-TPP (*scramble*) y nanopartículas de quitosán-TPP no acomplejadas con ADN plasmídico (quitosán). Setenta y dos horas post-tratamiento se aisló el ARN total. La expresión de GDH se determinó mediante RT-qPCR utilizando los oligonucleótidos CG1543 y CG1544. Se muestran los niveles relativos de ARNm de GDH normalizados en relación a la media geométrica de los niveles de ARN de *elongation factor 1 α* (EF-1 α), β -actina y la subunidad ribosomal 18s. Los valores correspondientes a los controles se ajustaron a 1. Los resultados corresponden a los valores \pm DE de al menos 7 peces. La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0,001$ (***) para la prueba *t-Student*.

4.9 EFECTO DE LA SILENCIACIÓN DEL ARNm DE GDH SOBRE LA ACTIVIDAD GDH EN HÍGADO DE *S. AURATA*

A fin de determinar si la actividad GDH se veía afectada como consecuencia del silenciamiento génico promovido por la administración de nanopartículas pCpG-sh2-GDH-quitosán-TPP (disminución significativa de los niveles hepáticos de ARNm de GDH hasta un 60% con respecto a los controles), se analizó la actividad de dicha enzima en el hígado de los peces tratados con el complejo SH2 y con el complejo *scramble*.

La actividad de GDH fue analizada en los dos sentidos de la reacción que puede catalizar de manera reversible la enzima: en el sentido de formación de L-glutamato (reacción reductora) y en el de formación de α -cetoglutarato (reacción oxidativa). Como se muestra en la figura 30 A, los peces tratados con SH2 mostraron una reducción significativa en la actividad de GDH en ambas direcciones respecto al control *scramble* (55,4 % y 52,9% en las actividades reductora y oxidativa respectivamente).

Mediante *Western blot* se determinaron los niveles de proteína GDH en hígado de peces control *scramble* y en los peces tratados con SH2, resultados que se muestran en la figura 30 B. En consonancia con los niveles de ARNm y actividad, los valores de proteína GDH inmunodetectable observados en los peces tratados con SH2 fueron inferiores que en los peces control (*scramble*).

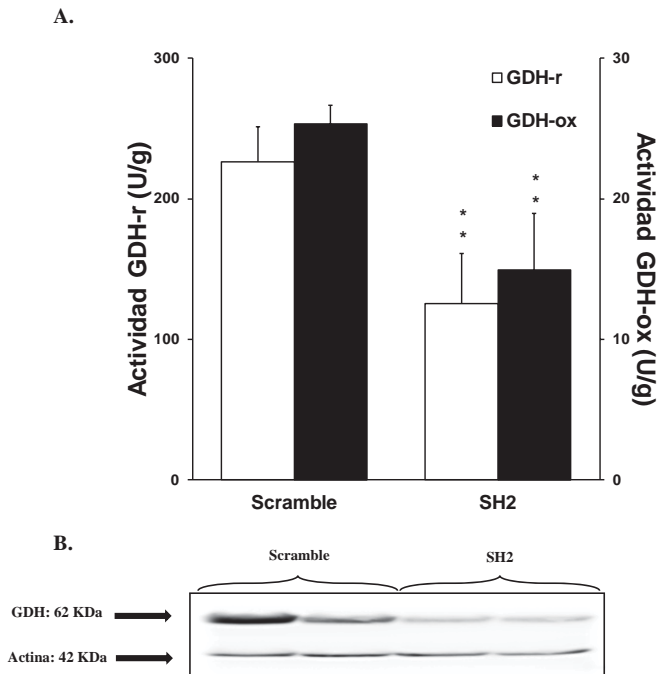


Figura 30. Efecto de SH2 sobre la actividad GDH en hígado de *S. aurata*

A. Las actividades GDH reductora (GDH-r) y GDH oxidativa (GDH-ox) se determinaron en los extractos de hígado de dorada tratadas con los complejos SH2 y *scramble*. Los valores representados corresponden a la actividad específica de GDH-r y GDH-ox, expresada como valor de la media \pm DE (n=6). La significancia estadística en relación al control (*scramble*) se indica por: $P < 0.01$ (**) para la prueba *t-Student*. **B.** Imagen representativa de GDH inmunodetectable (62 KDa) en extractos hepáticos normalizados con actina (42 KDa), utilizando la técnica de *Western blot*.

4.10 EFECTO METABÓLICO DE LA SILENCIACIÓN GÉNICA DE GDH EN HÍGADO DE *S. AURATA*

A fin de determinar cómo afecta la disminución de la actividad GDH, consecuencia del silenciamiento del ARNm, al metabolismo de los peces, se analizó el efecto del tratamiento con el complejo SH2 durante 72 horas sobre enzimas clave que catalizan reacciones del metabolismo intermediario hepático en dorada.

4.10.1 Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre la actividad de las transaminasas

El h3gado tiene diversas transaminasas que permiten sintetizar y metabolizar los amino3cidos para convertirlos en mol3culas de almacenaje de energ3a. Cuantitativamente las dos principales transaminasas son la ALT y la AST. A fin de estudiar el efecto de la inhibici3n de la actividad GDH sobre la actividad de las transaminasas, se ensay3 la actividad enzim3tica de ALT y AST en extractos hep3ticos de peces tratados con SH2 y peces control (*scramble*).

En los peces tratados con el complejo SH2 se produjo una inhibici3n significativa de la actividad enzim3tica AST presente en los extractos hep3ticos con respecto a los peces control. No se observaron cambios significativos en la actividad ALT entre los peces tratados con SH2 y control, aunque se apreci3 una tendencia a la baja en los peces sometidos a silenciaci3n de la expresi3n de GDH (figura 31).

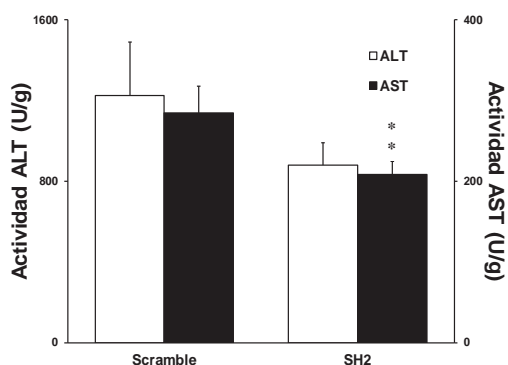


Figura 31. Efecto de SH2 sobre las actividades ALT y AST en h3gado de *S. aurata*

Las actividades AST y ALT se determinaron en los extractos hep3ticos obtenidos de peces tratados con SH2 y peces control (*scramble*). Los valores representados corresponden a la actividad espec3fica de AST y ALT, expresada como valor de la media \pm DE (n=6). La significancia estadística en relaci3n al control *scramble* se indica por: $P < 0.01$ (**) para la prueba *t-Student*.

4.10.2 Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre la gluc3lisis

A fin de estudiar el efecto de la inhibici3n de la actividad GDH sobre v3a glucol3tica, se determinaron las actividades enzimáticas de PFK-1 y PK en los extractos hepáticos de peces tratados 72 horas con SH2 y peces control (*scramble*).

Los peces tratados con el complejo SH2 no presentaron modificaciones significativas de la actividad enzimática PFK-1 ni de la PK presente en los extractos hepáticos, con respecto a los peces control (figura 32).

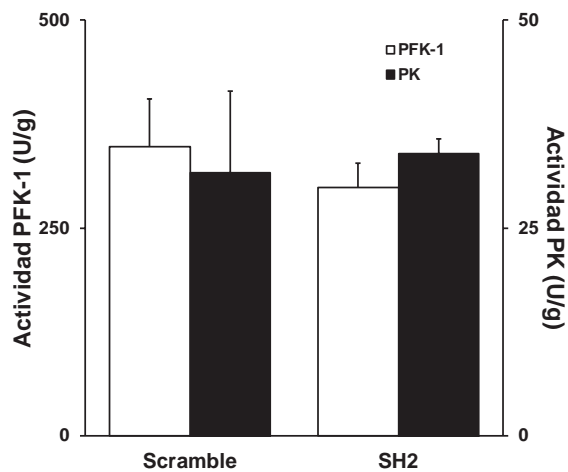


Figura 32. Efecto de SH2 sobre la actividad PFK-1 y PK en h3gado de *S. aurata*

Las actividades PFK-1 (Fosfofructoquinasa-1) y PK (piruvato quinasa) se determinaron en los extractos de h3gado de dorada tras el tratamiento con SH2 o el complejo *scramble* (control). Los valores representados corresponden a la actividad espec3fica de PFK-1 y PK, expresada como valor de la media \pm DE (n=6).

4.10.3 Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre la gluconeog3nesis

Para analizar el efecto de la silenciaci3n de GDH sobre la gluconeog3nesis hepática se ensay3 la actividad FBPasa-1, enzima que participa en el control del ciclo de sustrato fructosa-6-fosfato/fructosa-1,6-bisfosfato, catalizando la reacci3n opuesta a la de la enzima glucol3tica PFK-1.

Como se puede observar en la figura 33, los peces tratados con el complejo SH2 mostraron una disminuci3n significativa de la actividad enzimática FBPasa-1 presente en los extractos hepáticos, con respecto a los peces control.

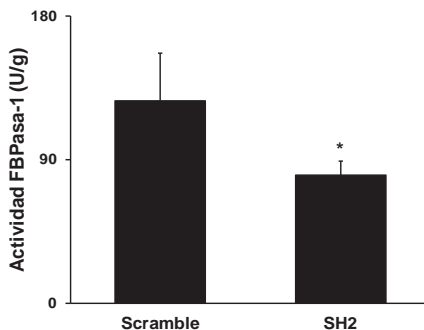


Figura 33. Efecto de SH2 sobre la actividad FBPassa-1 en hígado de *S. aurata*

La actividad FBPassa-1 se determinó en los extractos hepáticos de peces tratados con SH2 y peces control (*scramble*). La actividad se expresa como la media ± DE (n=6). La significancia estadística en relación al control *scramble* se indica por: $P < 0.05$ (*) para la prueba *t-Student*.

Dado que las reacciones catalizadas por PFK-1 y FBPassa-1, con sentido opuesto, son determinantes en la regulación del flujo glucolítico-gluconeogénico a través del control del ciclo de sustrato fructosa-6-fosfato/fructosa-1,6-bisfosfato, calculamos el efecto que tiene la silenciación de la expresión de GDH sobre la relación PFK-1/FBPassa-1 a nivel de actividad enzimática.

Como se observa en la figura 34, la silenciación génica de GDH mediante la administración del complejo SH2 promovió un incremento significativo de la relación PFK-1/FBPassa-1 y en consecuencia favoreció la ruta glucolítica en detrimento de la vía gluconeogénica con respecto a los peces control.

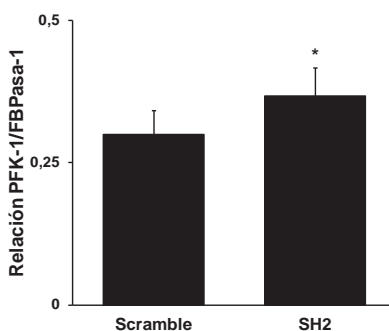


Figura 34. Relación entre PFK-1/FBPassa-1 en hígado de *S. aurata*

La relación PFK-1/FBPassa-1 se determinó a partir de los valores independientes de actividad enzimática cada muestra. Los valores representados corresponden a la relación de actividades específicas de PFK-1 y FBPassa-1, expresadas como valor de la media ± DE (n=6). La significancia estadística en relación al *scramble* se indica por: $P < 0.05$ (*) para la prueba *t-Student*.

4.10.4 Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre la v3a de las pentosas fosfato

A fin de estudiar el efecto de la silenciaci3n de GDH sobre v3a de las pentosas fosfato, se ha ensayado las actividades de G6PDH y 6PGDH, enzimas que catalizan las reacciones limitantes de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato, en los extractos hep3ticos de peces tratados con SH2 y peces control (*scramble*).

En los peces tratados con el complejo SH2 no se observaron cambios significativos en la actividad enzim3tica de G6PDH ni 6PGDH en extractos hep3ticos (figura 35).

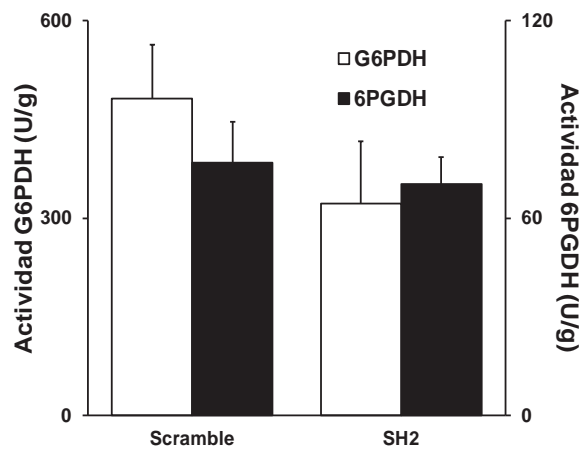


Figura 35. Efecto de SH2 sobre las actividades G6PDH y 6PGDH en h3gado de *S. aurata*

Las actividades G6PDH y 6PGDH se determinaron en los extractos de h3gado de peces tratados con SH2 y control (*scramble*). Los valores representados corresponden a la actividad espec3fica de G6PGH y 6PGDH, expresados como media \pm DE (n=6). La significancia estad3stica en relaci3n al control *scramble* se indica por: $P < 0.05$ (*).

4.10.5 Efecto de la silenciaci3n g3nica de GDH sobre el ciclo del 3cido tricarb3x3lico

La isocitrato deshidrogenasa (IDH) y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (KDH) son dos de las enzimas limitantes del ciclo del 3cido tricarb3x3lico o de Krebs. A fin de estudiar el efecto de la silenciaci3n de GDH sobre este ciclo, se ha ensayado la actividad enzim3tica de IDH y KDH en los extractos hep3ticos de peces tratados con SH2 y peces control (*scramble*).

Los peces tratados con el complejo SH2 mostraron un aumento significativo de la actividad enzimática KDH presente en los extractos hepáticos, con respecto a los peces control. No se observaron cambios significativos en la actividad IDH (figura 36).

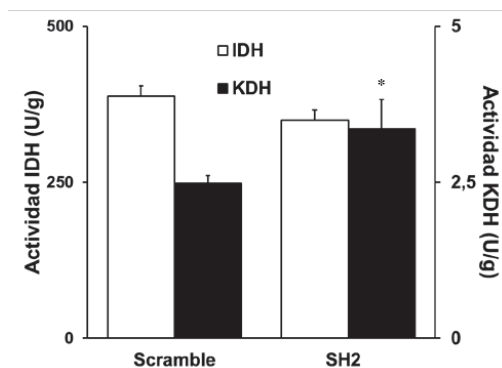


Figura 36. Efecto de SH2 sobre las actividades IDH y KDH en hígado de *S. aurata*
 Las actividades IDH y KDH se determinaron en los extractos hepáticos de peces tratados con SH2 y peces control (*scramble*). Los valores representados corresponden a la actividad específica de IDH y KDH, expresada como valor de la media \pm DE (n=6). La significancia estadística en relación al control *scramble* se indica por: $P < 0.05$ (*).

4.10.6 Efecto de la silencianción génica de GDH sobre la concentración de glucosa y triglicéridos en suero

Los niveles de glicemia y triglicéridos en suero de dorada tras 72 horas del tratamiento de la inoculación vía intraperitoneal del complejo SH2, no mostraron cambios significativos con respecto a los peces control (*scramble*) (Figura 37)

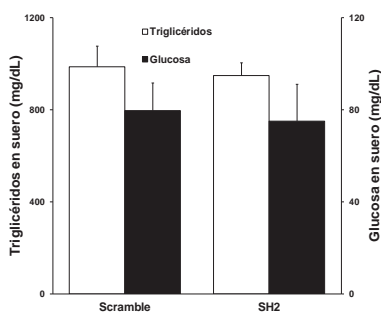


Figura 37. Determinación de metabolitos de suero en *S. aurata*
 Determinación de glucosa y triglicéridos en suero de peces tratados con el complejo SH2 y peces control (*scramble*). Los valores representan la media \pm DE (n=6).

4.11 EFECTO DE LA SILENCIACIÓN GÉNICA DE GDH SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMINOÁCIDOS EN HÍGADO DE *S. AURATA*

El hecho de que GDH desempeña un papel importante en el metabolismo de aminoácidos y la desintoxicación de amoníaco en el hígado a través de la desaminación oxidativa de L-glutamato nos llevó a analizar los cambios en el perfil hepático de aminoácidos y moléculas relacionadas como resultado del silenciamiento de GDH.

Tabla 5: Efecto del silenciamiento de GDH en los niveles de aminoácidos y moléculas relacionadas en el hígado de *S. aurata*.

Metabolito	Scramble (nmol/mg hígado)	SH2 (nmol/mg hígado)
Taurina	11.96 ± 0.57	12.18 ± 0.80
Urea	2.78 ± 0.45	2.77 ± 0.35
Aspartato	1.90 ± 0.15	2.09 ± 0.17
Treonina	2.54 ± 0.10	3.08 ± 0.68
Serina	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.13
Asparagina	0.28 ± 0.13	0.29 ± 0.11
Glutamato	5.37 ± 0.53	4.30* ± 0.40
Glutamina	1.46 ± 0.16	0.94** ± 0.05
Sarcosina	6.89 ± 1.42	6.48 ± 0.86
Prolina	0.52 ± 0.21	0.71 ± 0.08
Glicina	2.33 ± 0.39	2.57 ± 0.54
Alanina	7.94 ± 1.18	7.95 ± 0.70
α-ácido aminobutírico	0.16 ± 0.02	0.12* ± 0.03
Valina	0.14 ± 0.02	0.18 ± 0.03
Metionina	0.13 ± 0.02	0.16* ± 0.02
Cistationina	0.51 ± 0.09	0.59 ± 0.33
Isoleucina	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Leucina	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.03
Tirosina	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02
β-Alanina	0.44 ± 0.19	0.41 ± 0.15
Fenilalanina	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.01
Ornitina	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.03
Lisina	0.40 ± 0.07	0.57 ± 0.15
Histidina	0.46 ± 0.08	0.56 ± 0.08
Arginina	0.20 ± 0.03	0.24 ± 0.06

Los niveles de metabolitos se analizaron en extractos crudos de hígado 72 horas después de la administración de 10 µg de pCpG-siRNA-Scramble (Scramble) o quitosano-TPP-pCpG-SH2GDH (SH2) por gramo de peso corporal. Los valores se expresan como media ± DE (n = 5). La significación estadística relacionada con el control de peces (Scramble) se indica de la siguiente manera: * P <0.05; ** P <0.01.

El efecto de la silencianción de GDH sobre la concentración de aminoácidos en hígado de peces tratados con SH2 y peces control (*scramble*) se analizó mediante HPLC

siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.37. La administración de nanopartículas de SH2-GDH a *S. aurata* disminuyó significativamente el glutamato y la glutamina hasta aproximadamente en 80% y en 64% de los valores respectivos observados en los peces control. Entre otros aminoácidos y metabolitos relacionados, el silenciamiento de GDH también disminuyó el ácido α -aminobutírico hasta aproximadamente el 76% de los valores de control mientras que aumentó los niveles de metionina 1,2 veces (Tabla 5).

Dado que la silenciación génica de GDH promueve un descenso notable en los niveles hepáticos de Glu y Gln, nos propusimos comprobar si los niveles de α -cetoglutarato, cetoácido precursor de Glu y sustrato de la reacción reductora catalizada por GDH, mostraron afectación por el descenso de actividad GDH en hígado de dorada. Para ello, se determinó la concentración de α -cetoglutarato en extractos de hígado 72 horas tras el tratamiento con SH2 y en peces control, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.36.2.

En la figura 38 se observa que los niveles de α -cetoglutarato en extractos hepáticos de los peces tratados con el complejo SH2 mostraron un incremento significativo con respecto a los peces control.

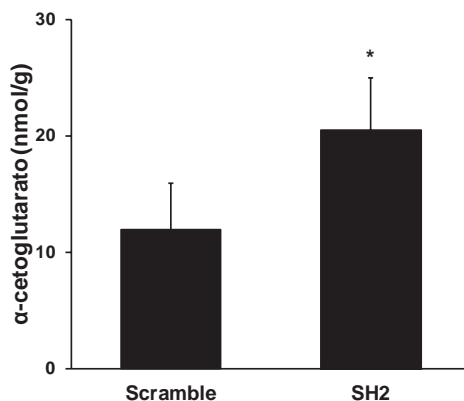


Figura 38. Determinación de los niveles de α -cetoglutarato en hígado de *S. aurata*

Determinación de α -cetoglutarato en extractos hepáticos de peces tratados con el complejo SH2 y peces control (*scramble*). Los valores representan la media \pm DE (n=6). La significancia estadística en relación al control *scramble* se indica por: $p < 0.05$ (*).

5. DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL ARNm Y PROMOTOR DE GDH EN *S. AURATA*

5.1.1 Alineación de secuencia y análisis filogenético de GDH

El principal sitio de catabolismo de los aminoácidos es el hígado y principalmente implica la transaminación, en la que el grupo amino de una variedad de aminoácidos se transfiere a α -cetoglutarato para producir glutamato, que a su vez puede desaminarse mediante GDH. El hecho de que el papel molecular de la GDH en los peces permanece mayormente inexplorado nos llevó a estudiar el rol que desempeña GDH sobre el metabolismo intermediario en *S. aurata*. Para este fin, inicialmente aislamos la secuencia completa del ADNc de GDH de hígado de *S. aurata*.

Teniendo en cuenta que *S. aurata* pertenece a la subdivisión de *Percomorphaceae* de peces teleosteos, no es sorprendente que la alineación de la secuencia de aminoácidos de GDH de *S. aurata* con secuencias de GDH reportadas para otras especies de peces dio la identidad más alta (> 96%) con especies de la misma subdivisión (*Lates calcarifer*, *Nothobranchius furzeri*, *Paralichthys olivaceus* y *Xiphophorus maculatus*). Se encontró una identidad ligeramente inferior en comparación con las especies de peces filogenéticamente distantes, como *Salmoniformes* (*Salmo salar*) y *Cypriniformes* (*Danio rerio*) (Betancur-R *et al.*, 2013).

La GDH de *S. aurata* conserva todos los aminoácidos involucrados en la unión de glutamato y la inhibición de GTP (30 aminoácidos en total), y la mayoría de los residuos considerados de importancia para la unión de NAD^+ , pirofosfato de tiamina y la activación de ADP (51 de 58) (Bunik *et al.*, 2016). Más aún, el análisis de los aminoácidos no conservados implicados en la reacción catalítica y la regulación alostérica de la actividad enzimática revela que 6 de un total de 7 corresponden a mutaciones conservadas. La única diferencia significativa entre especies de peces de la subdivisión de *Percomorphaceae* (incluyendo *S. aurata*) y GDH de mamíferos reside en la sustitución de un residuo de serina implicado en la unión de NAD^+ por Gly368 en GDH de *S. aurata*. Si esta sustitución produce cambios significativos en el comportamiento cinético de la GDH de peces es aún desconocido. No obstante, la similitud general con la GDH de mamíferos sugiere un alto grado de conservación de la estructura y, posiblemente, el mecanismo de reacción durante la evolución de los vertebrados.

5.1.2 Caracterización del promotor GDH y regulación transcripcional por USF2.

Poco se sabe acerca de la regulación transcripcional de la expresión de GDH en vertebrados. El análisis *in silico* permitió la detección de sitios potenciales de unión para una serie de factores de transcripción, tales como Sp1, AP-1 y AP-2 en seres humanos, y Sp1 y Zif268 en ratas (Das *et al.*, 1993; Michaelidis *et al.*, 1993). La funcionalidad de estos sitios sigue siendo poco clara. Posteriormente, Hardin y colaboradores encontraron una región sensible a glucocorticoides en el promotor GDH de la línea celular derivada de astrocitos de ratón, C8S (Hardin-Pouzet *et al.*, 1996). Por otra parte, Bundy y colaboradores, reportaron que la delección del gen que codifica para el coactivador transcripcional p300 en la línea celular de carcinoma de colon humano HCT116 regula negativamente la expresión de GDH (Bundy *et al.*, 2006). A pesar del importante papel ejercido por GDH en diversos tejidos, a nuestro conocimiento no hay estudios que se hayan dirigido al aislamiento y la caracterización molecular del promotor del gen *gdh* en peces.

Con el objetivo de aumentar el conocimiento actual sobre la regulación transcripcional del gen *gdh*, en el presente estudio se caracterizó el promotor de la GDH de *S. aurata*. Un fragmento de 2057 pb adyacente a la región 5' del ADNc que codifica para la GDH fue aislado después de un recorrido cromosómico a partir de ADN genómico de *S. aurata*. La funcionalidad de la presunta región promotora de GDH fue estudiada al transfectar células HepG2 con constructos de fusión del fragmento genómico aislado con el gen reportero de luciferasa. Se realizaron delecciones secuenciales del extremo 5' de un fragmento de 1286 pb y se efectuó el análisis de la actividad promotora después de la transfección de estos constructos en células HepG2. Estos estudios indicaron que la región promotora que contiene los 70 pb corriente arriba respecto al inicio de transcripción del gen es esencial para la actividad basal de GDH y constituye el núcleo funcional del promotor para ese gen.

La presencia de lugares de unión a USF2 en el promotor aislado nos llevó a investigar la posible implicación de este factor de transcripción en el control de la expresión de GDH. Los factores de transcripción USF pertenecen a la familia de proteínas *Helix-Loop-Helix-Leucine-Zipper* (bHLHzip) y están codificados por dos genes diferentes: *usf1* y

usf2. Las proteínas USF regulan la transcripción de un gran número de genes implicados en el estrés, las respuestas inmunitarias, el ciclo celular y la proliferación, y el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Dentro de las rutas metabólicas, regulan un amplio número de genes caracterizados por la presencia de motivos *E-box* en sus regiones promotoras, tales como el gen de la insulina (Read, Clark and Docherty, 1993), el gen de la proteína de unión al factor de crecimiento de la insulina tipo 1 (IGF-BP1) (Matsukawa *et al.*, 2001), receptor del glucagón (Martin *et al.*, 2003a), glucoquinasa (Iynedjian, 1998) y el gen de la subunidad catalítica de G6Pasa (Roth, Jungermann and Kietzmann, 2004). Además, también están involucrados en la lipogénesis, la regulación de la ácido graso sintasa, apolipoproteína, lipasa hepática, acetil-CoA, y los genes de las carboxilasas. (Corre and Galibert, 2005).

Se evaluó las diferentes isoformas de USF para determinar si este factor de transcripción tiene la misma capacidad de regular la transcripción del gen *gdh*, dado que, en general los factores de transcripción b-HLH-LZ se unen a la secuencia *E-box* CANNTG, donde los dos nucleótidos centrales (NN) son en la mayoría de los casos GC o CG, y que alterar el espaciamiento con otros nucleótidos anula la unión. Por lo tanto, la conservación de la secuencia palindrómica corta es importante, incluso una variación de nucleótido favorece la unión de una de las isoformas de USF. Estudios de transfección transitoria en células HepG2 y ensayos EMSA nos permitieron demostrar que USF2 transactiva la actividad promotora de *gdh* en *S. aurata* a través de la unión a la secuencia *E-box* situada en las posiciones -10 a -5 en sentido ascendente desde el inicio transcripcional. La transactivación de *gdh* por USF se confirmó mediante la introducción de mutaciones en la secuencia *E-box* que abolieron la unión de USF2 y la transactivación de GDH.

El hígado de peces es el sitio principal para el catabolismo de aminoácidos, donde GDH ejerce un papel importante en la transaminación de aminoácidos catalizando la desaminación oxidativa del glutamato y dando lugar al producto final del catabolismo proteico, el amoníaco (Lushchak, Husak and Storey, 2008). Como en otras especies de peces (Liu *et al.*, 2012) y de forma similar a los mamíferos (Plaitakis *et al.*, 2017a), encontramos que GDH se expresa principalmente en el hígado de *S. aurata*, mientras que también se observan altos niveles de mRNA en el riñón, corazón e intestino. En contraste

con GDH, USF2 mostró una expresión ubicua en los diferentes tejidos de *S. aurata*, aunque se encontraron mayores niveles de ARNm en el cerebro, el bazo, el corazón, las branquias, el riñón y el hígado. Estos resultados son consistentes con el patrón de distribución tisular de USF2 en otros vertebrados (Sirito *et al.*, 1994; Fujimi and Aruga, 2008). Nuestros hallazgos sugieren que, además de la transactivación del promotor *gdh* por USF2, otros factores de transcripción aún desconocidos pueden contribuir a la regulación tisular de los niveles de ARNm de GDH en peces. Modificaciones postraduccionales como la fosforilación o la interacción con otros factores de transcripción y cofactores también pueden explicar las diferencias específicas del tejido en la acción de USF2 (Spohrer *et al.*, 2016).

Dado que la expresión de GDH puede considerarse un marcador significativo para la utilización de proteínas y la excreción de amoníaco en los peces (Liu *et al.*, 2012), también se abordó el efecto del estado nutricional en los niveles de ARNm hepático de GDH, y el papel que USF2 puede tener en la transcripción *gdh* bajo ayuno y durante la realimentación el hígado de *S. aurata*. El ayuno a largo plazo afectó de manera similar a la expresión hepática de USF2 y GDH, que disminuyó significativamente hasta aproximadamente el 60% de los valores observados en los peces alimentados. La regulación negativa de la expresión de GDH en *S. aurata* en ayuno puede estar relacionada con un mecanismo que previene la secreción de insulina en las células β . En favor de esta hipótesis, la sobreexpresión de GDH en ratones aumenta la secreción de insulina (Carobbio and Maechler, 2004), mientras que la inhibición de GDH en las células β pancreáticas disminuye la secreción de insulina (Carobbio *et al.*, 2009). Además, mutaciones que promueven la activación de GDH causan hiperinsulinemia e hiperamonemia en los seres humanos (Li *et al.*, 2014; Barrosse-Antle *et al.*, 2017). El efecto del estado nutricional en la expresión de GDH depende de la especie en los peces.

En contraste con *S. aurata*, el ayuno no afectó la actividad de GDH en *Salmo gairdneri* (Tranulis *et al.*, 1991), mientras que aumentó la actividad de GDH en el hígado de *Oncorhynchus mykiss*, *Protopterus dolloi* y *Dentex dentex* y los niveles de ARNm de GDH en *Danio rerio* (Sánchez-Muros *et al.*, 1998; Frick *et al.*, 2008; Pérez-Jiménez *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2015). No podemos descartar que además de la especie, las diferencias en el efecto del ayuno sobre la expresión de GDH entre los experimentos

pueden resultar también de la composición de la dieta a la que estaban sometidos los peces antes de la restricción alimentaria, el tamaño de la ración y el régimen de alimentación. En este sentido, es bien sabido que la proteína dietética influye en gran medida la actividad hepática de GDH en los peces (Liu *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2013; Coutinho *et al.*, 2015; Viegas *et al.*, 2015). De hecho, no afectó la actividad de GDH en el hígado de *Dicentrarchus labrax* alimentadas con una dieta altas en proteínas (Pérez-Jiménez *et al.*, 2007). Por otra parte, el ayuno disminuyó los niveles de ARNm hepático de USF2 en el hígado de *S. aurata*. En este sentido, se demostró previamente que niveles altos de glucosa regulan positivamente la expresión de USF2 en células HK-2 humanas y células mesangiales primarias de rata (Shi *et al.*, 2008). Por lo tanto, los niveles bajos de glicemia asociados a la inanición a largo plazo pueden ser críticos para disminuir la expresión de USF2, que a su vez puede conducir a la disminución de los niveles de ARNm de GDH en el hígado de *S. aurata*.

Los niveles de ARNm de USF2 y GDH siguieron el mismo patrón de expresión después de una realimentación a corto y largo plazo en el hígado de *S. aurata*: una recuperación lenta pero gradual de los valores observados en los peces alimentados. Cinco días de realimentación no promovieron cambios significativos en la expresión de los niveles de USF2 y GDH, con respecto a los peces ayunados. Sin embargo, 14 días de realimentación permitieron restaurar los valores previos a la inanición. Además, los valores de ARNm de USF2 y GDH en el hígado de peces realimentados después de 14 días mostraron una tendencia a presentar niveles ligeramente superiores a los peces alimentados. Del mismo modo, la realimentación a largo plazo después de la inanición aumentó la actividad de GDH en el hígado de *Dicentrarchus labrax* y *Dentex dentex* a valores superiores a los de los peces control (Pérez-Jiménez *et al.*, 2007, 2012). Es posible que la realimentación después de un ayuno prolongado pueda requerir un largo período de adaptación que implique mayor catabolismo de nutrientes para restaurar los parámetros metabólicos, como se ha señalado para otras enzimas clave involucradas en el metabolismo intermediario (Soengas *et al.*, 2006; Polakof, Míguez and Soengas, 2007). Por lo tanto, una expresión hepática aumentada de GDH puede ser esencial para la desaminación de glutamato y transaminación de aminoácidos dietéticos en peces realimentados a largo plazo para proporcionar α -cetoglutarato para el ciclo de Krebs y suministrar ATP para demandas energéticas y biosíntesis. El hecho de que los niveles de

ARNm de USF2 mostraron una correlación completa con la expresión de GDH durante el ayuno y después de realimentación a corto y largo plazo sugiere que USF2 puede tener un papel importante en la regulación de la actividad transcripcional del promotor del gen *gdh* en el hígado de *S. aurata* frente a cambios en el estado nutricional. La implicación de USF2 en la expresión de genes que codifican enzimas clave en el metabolismo de aminoácidos, como GDH, es consistente con observaciones anteriores que muestran el control transcripcional de genes relacionados con el metabolismo energético de lípidos y carbohidratos por miembros de la familia USF en mamíferos (Shih and Towle, 1994; Lefrançois-Martinez *et al.*, 1995; Iynedjian, 1998; Martin *et al.*, 2003b; Corre and Galibert, 2005; Pawlus *et al.*, 2012).

5.1.3 cMYB: Posible activador de la transcripción de GDH

El gen c-Myb es un homólogo celular del oncogene v-Myb (viral-Myb) (Zhou and Ness, 2011), el cual funciona principalmente como un activador transcripcional mediante la unión a la secuencia t/cAACT/gG, que se conoce como MBS (Biedenkapp *et al.*, 1988).

c-Myb puede regular la expresión de genes claves en el metabolismo de aminoácidos en la dorada, como la ALT citosólica (Anemaet *et al.*, 2010), además de jugar un papel crucial durante la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (Ramsay and Gonda, 2008). Estos estudios más el análisis bioinformático del promotor GDH, nos llevó a investigar la posible implicación de c-Myb en el control transcripcional de GDH.

Se evaluó si el factor de transcripción c-Myb tiene capacidad de regular la transcripción del gen *gdh*. Estudios de transfección transitoria en células HepG2 y ensayos con deleciones de los posibles sitios de unión a c-Myb en la región promotora de la GDH nos permitieron demostrar que c-Myb activa la transcripción del promotor del gen *gdh* en *S. aurata*. Así también, nuestros datos indican que posiblemente haya más de un sitio de unión al factor de transcripción c-Myb. Este factor de transcripción en su mayoría tienen grupos de dos o más MBS en sus genes dianas (Ramsay and Gonda, 2008), así también trabaja junto con otros co-reguladores para activar la transcripción de genes por ejemplo, CREB-coactivador transcripcional, o CBP, y la proteína p300 (Rushton *et al.*, 2003). Para confirmar si realmente c-Myb participa en la activación de la expresión de GDH, será necesario realizar ensayos que confirmen esta hipótesis como, por ejemplo: EMSA, Chip-seq o mutagénesis dirigida.

5.2 EFECTO METABÓLICO DEL SILENCIAMIENTO HEPÁTICO DE GDH

Teniendo en cuenta que GDH desempeña un papel fundamental en el metabolismo de los aminoácidos para obtener energía y proveer sustratos gluconeogénicos, y habiendo demostrado que el nivel de ARNm de GDH es regulado transcripcionalmente por el estado nutricional, el aislamiento del ADNc de la GDH de *S. aurata*, nos ha permitido diseñar sh-ARNs para realizar una silenciación de la expresión del ARNm que codifica para la GDH en hígado de *S. aurata* y analizar los efectos metabólicos derivados del silenciamiento. La validación *in vitro* de cinco sh-ARNs seleccionados se realizó en células HepG2 cotransfectadas con sh-ARN y el plásmido de expresión de la GDH de *S. aurata*. El sh-ARN más efectivo *in vitro* (SH2) se seleccionó posteriormente para evaluar los efectos metabólicos del silenciamiento génico de GDH *in vivo*. Como vector para administrar pCpG-sh2-GDH (plásmido de expresión SH2) en los hepatocitos de *S. aurata*, hicimos uso de quitosán.

El complejo ADN-quitosán se produce como resultado de la interacción entre los grupos amino cargados positivamente del quitosán y los grupos fosfatos del ADN (Nimesh *et al.*, 2010). El quitosán es un polisacárido compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina que es generado a partir de una deacetilación parcial de la quitina (Brugnerotto *et al.*, 2001; Berth and Dautzenberg, 2002). Gracias a ciertas ventajas, tales como, ser biodegradable, biocompatible y no inmunogénico, el quitosán ha sido ampliamente estudiado para diversas aplicaciones biotecnológicas. Además, el quitosán ha demostrado ser un eficiente sistema de transfección de ADN *in vivo* en diversos tejidos y en especial en el hígado (Richardson, Kolbe and Duncan, 1999; Schatzlein *et al.*, 2005; González *et al.*, 2016; Sáez *et al.*, 2017).

En este sentido, nuestro grupo ha silenciado recientemente la expresión de ALT citosólica en el hígado de *S. aurata* por medio de la administración intraperitoneal de nanopartículas de quitosán-TPP acoplejadas con un plásmido que expresa un sh-ARN para silenciar ALT de *S. aurata*. El silenciamiento de la ALT citosólica afectó la actividad de enzimas claves de la glucólisis mientras que no tuvo efecto sobre la gluconeogénesis (González *et al.*, 2016). Con base en la misma metodología, en el presente estudio utilizamos la técnica de gelificación iónica, un método basado en las interacciones entre el quitosán de bajo peso molecular y los polianiones tales como TPP (Fàbregas *et al.*

2013), para encapsular pCpG-SH2-GDH (plásmido de expresión de SH2) y analizar el efecto del silenciamiento de GDH en el metabolismo hepático de *S. aurata*. Setenta y dos horas después de la administración intraperitoneal de quitosán-TPP-pCpG-SH2-GDH, la expresión de GDH a niveles de ARNm, proteína inmunodetectable y actividad enzimática oxidativa y reductora se redujo significativamente en el hígado de los peces tratados.

El silenciamiento de GDH promovió cambios significativos en los niveles hepáticos del sustrato y producto de GDH: glutamato y α -cetoglutarato. Aunque la dirección del flujo de la catálisis de GDH *in vivo* sigue siendo controvertida, en el presente estudio la disminución de la expresión de GDH afectó de manera similar a las reacciones reductoras y oxidativas. Como resultado del silenciamiento de GDH, los niveles de α -cetoglutarato aumentaron en el hígado de *S. aurata*. Los valores elevados de α -cetoglutarato pueden explicar el aumento de la actividad de OGDH, un complejo enzimático clave del ciclo de Krebs. De manera consistente con el aumento de los niveles de α -cetoglutarato, una disminución de la actividad de GDH condujo a los efectos opuestos en el contenido hepático de glutamato. Dado que el α -cetoglutarato se puede convertir en glutamato por la acción de la GDH o las transaminasas, es posible que los niveles bajos de glutamato se hayan reforzado por la inhibición de ALT y AST, que se consideran cuantitativamente las aminotransferasas más importantes en el hígado de peces (Walton and Cowey, 1982). En general, nuestros hallazgos apuntan a la disminución de la actividad de las transaminasas y la reducción de la desaminación como resultado del silenciamiento del gen GDH en el hígado de *S. aurata*. De hecho, dado que la glutamina se puede sintetizar a partir del glutamato a través de la actividad catalítica de la glutamina sintetasa, los bajos niveles de glutamato pueden ser responsables de la disminución de los valores de glutamina observados en el hígado de los peces tratados con quitosán-TPP-pCpG-SH2-GDH.

Dado que la metionina es un aminoácido esencial en animales, el hecho de que los niveles de metionina fueran más altos en el hígado de peces tratados con nanopartículas de quitosano-TPP-pCpG-SH2-GDH sugiere que el silenciamiento de GDH disminuyó el metabolismo de la metionina, lo que a su vez los niveles de ácido aminobutírico. Teniendo en cuenta que recientemente se informó que las dietas altas en proteínas aumentan el ácido α -aminobutírico en humanos (Haschke-Becher et al. 2016), los bajos niveles de ácido α -aminobutírico en el hígado de los peces tratados también pueden ser consecuencia de un

descenso general en el metabolismo de aminoácidos como resultado del silenciamiento de GDH.

En un contexto con capacidad reducida de desaminación como resultado del silenciamiento del ARNm de GDH, el uso de aminoácidos como sustratos glucogénicos y cetogénicos, así como para producir energía al ingresar a vías catabólicas, puede verse comprometido. En este sentido, es notable que la disminución de la actividad GDH favoreció el incremento de la relación de actividad de PFK-1/FBPasa-1, lo que sugiere que la glucólisis se vio favorecida con respecto a la gluconeogénesis en el hígado de los peces tratados. Este cambio metabólico podría mejorar el uso de los carbohidratos de la dieta como combustible para la producción de energía.

Nuestros resultados son consistentes con el aumento de la utilización de glucosa en astrocitos de ratón tratados con siRNA para silenciar la expresión de GDH (Pajęcka *et al.*, 2015). Los autores concluyeron que la glucosa podría reemplazar al glutamato como sustrato energético en astrocitos deficientes en GDH sobre la base de que los astrocitos tratados con siARN pudieron mantener los niveles fisiológicos de ATP independientemente de la expresión de GDH. Además, en consonancia con el aumento de la actividad del complejo OGDH y los niveles elevados de α -cetoglutarato en el hígado de *S. aurata* tratados con nanopartículas de quitosán-TPP-pCpG-sh2-GDH, los astrocitos deficientes en GDH muestran un aumento del metabolismo de la glucosa asociado a un incremento del flujo del ciclo de Krebs desde α -cetoglutarato a oxaloacetato y de vías anapleróticas de regulación ascendente tales como la piruvato carboxilasa, para mantener la cantidad de intermediarios del ciclo de Krebs (Nissen *et al.*, 2015). De hecho, ratones transgénicos que sobreexpresan GDH2 humano mostraron una disminución general en el metabolismo de la glucosa oxidativa (Nissen *et al.*, 2017).

Finalmente, el efecto de la activación de la glucólisis y del ciclo de Krebs mediada por la silenciación transitoria de GDH, podría permitir sustituir, al menos parcialmente, proteína por carbohidratos en la dieta de doradas. Por lo tanto, se vería favorecida la utilización de los carbohidratos con fines energéticos, promoviendo así un efecto de ahorro de proteínas para la biosíntesis. Además, esto nos permitiría la reducción de los costos de producción y favorecer así una acuicultura más sostenible y con menor impacto ambiental.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Mediante la técnica de RACE 5' y 3' acoplado a PCR se ha clonado el ADNc que codifica para la GDH de *S. aurata*. El fragmento clonado es de 2715 pb y contiene un marco de lectura de 1629 pb. La secuencia de aminoácidos deducida para GDH de *S. aurata* predice una proteína de 542 aminoácidos con una masa molecular de 59,67 Kda.
2. El análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos de GDH de *S. aurata* guarda una identidad > 96% con especies que pertenecen a la misma subdivisión de *Percomorphaceae*. Así mismo, conserva todos los aminoácidos involucrados en la unión de glutamato y GTP, y la mayoría de residuos considerados de importancia para la unión de NAD⁺, TPP y ADP.
3. Mediante paseo cromosómico se clonó un fragmento de 2057 pb de la región adyacente al extremo 5' del ADNc que codifica la GDH de *S. aurata*. Estudios de transfección transitoria de células HepG2 con constructos reporteros del promotor delecionados indican que el promotor mínimo funcional de GDH reside en los 85 pb corriente arriba del inicio de la transcripción del gen *gdh*.
4. Ensayos de retardación en gel y de transfección transitoria de células HepG2 con constructos reporteros delecionados y mutados indican que USF2 transactiva el promotor del gen *gdh* de *S. aurata* a través de la unión a la secuencia *E-box* localizada entre las posiciones -10 a -5 en sentido ascendente desde el inicio de la transcripción.
5. El análisis mediante RT-qPCR de la expresión tisular de GDH y USF2 en *S. aurata* indica que GDH se expresa principalmente en el hígado, seguido de riñón, corazón e intestino. USF2 mostró una expresión ubicua, aunque se encontraron mayores niveles en cerebro, bazo, corazón, branquias, riñón e hígado.
6. La expresión hepática de GDH y USF2 disminuyó significativamente en peces sometidos a ayuno prolongado con respecto a los valores observados en peces alimentados. Además, siguieron el mismo patrón de expresión después de una realimentación a corto y largo plazo: una recuperación lenta pero gradual de los niveles de ARNm para ambas proteínas.

7. El efecto de la composición de la dieta, no produjo cambio significativo sobre la expresión hepática de USF2. Mientras que, una dieta rica en proteínas favoreció la expresión hepática de GDH con respecto a una dieta baja y media en proteína.
8. Ensayos de transfección transitoria en células HepG2 indican que el factor de transcripción c-MYB transactiva el promotor del gen *gdh* de *S. aurata* por unión a al menos dos elementos reguladores en *cis*.
9. La administración intraperitoneal de nanopartículas de quitosán-TPP encapsulando un plásmido de expresión de un sh-ARN para silenciar la expresión de GDH (pCpG-SH2-GDH), promueve 72 horas después del tratamiento un descenso significativo del 60 % en los niveles de ARNm de GDH en hígado de *S. aurata*. La expresión hepática disminuida de GDH promueve un descenso de la GDH inmunodetectable y una reducción del 55 % y 53 % en las actividades reductora y oxidativa, respectivamente, de la GDH.
10. La silenciación génica de GDH promueve una disminución significativa de la actividad ALT y una tendencia a la baja de la actividad AST en hígado.
11. La expresión disminuida de GDH en hígado de *S. aurata* disminuye la expresión de la actividad FBPasa-1 sin afectar a la de PFK-1, favoreciendo por lo tanto el flujo glucolítico respecto al gluconeogénico a nivel del ciclo de sustrato fructosa-6-fosfato/fructosa-1,6-bisfosfato.
12. La disminución de la actividad hepática de GDH promueve el aumento de la concentración de α -cetoglutarato, sustrato de la enzima en su actividad reductora, así como de la actividad del complejo OGDH, clave en el control del flujo del ciclo de Krebs.
13. La disminución de la actividad GDH da lugar a una disminución de la concentración de glutamato, producto de la reacción reductora de la GDH. Asimismo, los niveles de glutamina, altamente dependientes de glutamato, también descendieron en el hígado de doradas sometidas a silenciación génica de GDH.

14. Los resultados obtenidos permiten concluir que la silenciación de la expresión de GDH en hígado de *S. aurata* podría ser una diana de interés para favorecer la utilización de los carbohidratos de la dieta como sustrato energético y promover así un efecto de ahorro de proteínas, que permitiría reducir los costos de producción y reducir el impacto ambiental de la acuicultura.

7. REFERENCIAS

REFERENCIAS

A.

Aksan, I. and Goding, C. R. (1998) 'Targeting the Microphthalmia Basic Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper Transcription Factor to a Subset of E-Box Elements In Vitro and In Vivo', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM), 18(12), pp. 6930–6938. doi: 10.1128/MCB.18.12.6930.

Allen, A. *et al.* (2004) 'Evolution of glutamate dehydrogenase regulation of insulin homeostasis is an example of molecular exaptation', *Biochemistry*, 43(45), pp. 14431–14443. doi: 10.1021/bi048817i.

Andoh, T. (2007) 'Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*)', *General and Comparative Endocrinology*, 151(3), pp. 308–317. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.01.015.

Andrews, G. K. *et al.* (2001) 'The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development', *EMBO Journal*, 20(5), pp. 1114–1122. doi: 10.1093/emboj/20.5.1114.

Anemaet, I. G. *et al.* (2010) 'Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb', *Journal of Molecular Endocrinology*. BioScientifica, 45(3), pp. 119–132. doi: 10.1677/JME-10-0022.

ARRAINA (2016) 'Understanding Biomarkers in Fish Nutrition', ARRAINA 3r. Available at: http://www.arraina.eu/images/ARRAINA/Media_Center/Arraina_booklet-V6.pdf.

Atchley, W. R. and Fitch, W. M. (1997) 'A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), pp. 5172–5176. doi: 10.1073/pnas.94.10.5172.

Ayer, D. E., Kretzner, L. and Eisenman, R. N. (1993) 'Mad: A heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity', *Cell*, 72(2), pp. 211–222. doi: 10.1016/0092-8674(93)90661-9.

Azarias, G. *et al.* (2011) 'Glutamate Transport Decreases Mitochondrial pH and Modulates Oxidative Metabolism in Astrocytes', *Journal of Neuroscience*, 31(10), pp. 3550–3559. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4378-10.2011.

B.

Baeza, J., Smallegan, M. J. and Denu, J. M. (2015) 'Site-specific reactivity of nonenzymatic lysine acetylation', *ACS Chemical Biology*, 10(1), pp. 122–128. doi: 10.1021/cb500848p.

Baeza, J., Smallegan, M. J. and Denu, J. M. (2016) 'Mechanisms and Dynamics of Protein Acetylation in Mitochondria', *Trends in Biochemical Sciences*, pp. 231–244. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.006.

Bailey, J., Bell, T. and Bell, J. E. (1982) 'Bovine Glutamate Dehydrogenase', *The Journal of Biological Chemistry*, 257(10), pp. 5579–5583.

Ballif, B. A. *et al.* (2008) 'Large-scale identification and evolution indexing of tyrosine phosphorylation sites from murine brain', *Journal of Proteome Research*, 7(1), pp. 311–318. doi: 10.1021/pr0701254.

Banerjee, S. *et al.* (2003) 'Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation', *Biochemistry*, 42(12), pp. 3446–3456. doi: 10.1021/bi0206917.

Bañuelos-Vargas, I. *et al.* (2014) 'Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*)', *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 170, pp. 18–25. doi: 10.1016/j.cbpb.2014.01.003.

Barrosse-Antle, M. *et al.* (2017) 'A severe case of hyperinsulinism due to hemizygous activating mutation of glutamate dehydrogenase', *Pediatric Diabetes*. doi: 10.1111/pedi.12507.

Barthel, A. and Schmolz, D. (2003) 'Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis', *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 285(4), pp. E685–E692. doi: 10.1152/ajpendo.00253.2003.

- Baxevanis, A. D. and Vinson, C. R. (1993) 'Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity?', *Current Opinion in Genetics and Development*, 3(2), pp. 278–285. doi: 10.1016/0959-437X(93)90035-N.
- Beckmann, H., Su, L. K. and Kadesch, T. (1990) 'TFE3: A helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer μ E3 motif', *Genes and Development*, 4(2), pp. 167–179. doi: 10.1101/gad.4.2.167.
- Bell, R. A. V., Dawson, N. J. and Storey, K. B. (2012) 'Insights into the *In Vivo* Regulation of Glutamate Dehydrogenase from the Foot Muscle of an Estivating Land Snail', *Enzyme Research*. Hindawi, 2012, pp. 1–10. doi: 10.1155/2012/317314.
- Benezra, R. *et al.* (1990) 'The protein Id: A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins', *Cell*, 61(1), pp. 49–59. doi: 10.1016/0092-8674(90)90214-Y.
- Berg, J. ., Tymoczko, J. and Stryer, L. (2002) 'Amino Acids Are Made from Intermediates of the Citric Acid Cycle and Other Major Pathways', in *Biochemistry*. W H Freeman, pp. 1–17.
- Berth, G. and Dautzenberg, H. (2002) 'The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier, 47(1), pp. 39–51. doi: 10.1016/S0144-8617(00)00343-X.
- Betancor, M. B. *et al.* (2014) 'Daily rhythms in expression of genes of hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)', *PLoS ONE*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0106739.
- Betancur-R, R. *et al.* (2013) 'The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes', *PLoS Currents*. Public Library of Science, 5(APR 2013). doi: 10.1371/currents.tol.53ba26640df0ccae75bb165c8c26288.
- Beutler, E. and Kuhl, W. (1986) 'Characteristics and significance of the reverse glucose-6-phosphate dehydrogenase reaction.', *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 107(6), pp. 502–7.
- Bian, Y. *et al.* (2014) 'An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome', *Journal of Proteomics*, 96, pp. 253–262. doi: 10.1016/j.jprot.2013.11.014.
- Bibiano Melo, J. F. *et al.* (2006) 'Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae)', *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 145(2), pp. 181–187. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.06.007.
- Biedenkapp, H. *et al.* (1988) 'Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity.', *Nature*, pp. 835–837. doi: 10.1038/335835a0.
- Biroccio, A. *et al.* (2001) 'c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings.', *The American journal of pathology*, 158(4), pp. 1289–1299. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64080-1.
- Blackwell, T. K. *et al.* (1993) 'Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences.', *Molecular and cellular biology*, 13(9), pp. 5216–24. doi: 10.1128/MCB.13.9.5216.Updated.
- Blackwell, T. K. and Weintraub, H. (1990) 'Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection', *Science*, 250(4984), pp. 1104–1110. doi: 10.1126/science.2174572.
- Blackwood, E. M. and Eisenman, R. N. (1991) 'Max: A Helix-Loop-Helix Zipper Protein That Forms a Sequence-Specific DNA-Binding Complex with Myc', *Source: Science, New Series*, 251(4998), pp. 1211–1217. doi: 10.1126/science.2006410.
- Borges, P. *et al.* (2013) 'Protein utilisation and intermediary metabolism of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) as a function of protein:lipid ratio.', *The British journal of nutrition*, 109(8), pp. 1373–1381. doi: 10.1017/S0007114512003418.
- Bowyer, J. N., Qin, J. G. and Stone, D. A. J. (2013) 'Protein, lipid and energy requirements of cultured marine fish in cold, temperate and warm water', *Reviews in Aquaculture*, 5(1), pp. 10–32. doi: 10.1111/j.1753-5131.2012.01078.x.
- Breathnach, R. and Chambon, P. (1981) 'Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins', *Annual Reviews of Biochemistry*. USA, 50(1), pp. 349–386. doi: 10.1146/annurev.bi.50.070181.002025.

Brugnerotto, J. *et al.* (2001) 'Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution.', *Macromolecular Symposia*, 168(1), pp. 1–20. doi: 10.1002/1521-3900(200103)168:1<1::AID-MASY1>3.0.CO;2-W.

Bundy, J. G. *et al.* (2006) 'Metabolic consequences of p300 gene deletion in human colon cancer cells.', *Cancer research*, 66(15), pp. 7606–14. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2999.

Bunik, V. *et al.* (2016) 'Multiple Forms of Glutamate Dehydrogenase in Animals: Structural Determinants and Physiological Implications

Bunik, V., Artiukhov, A., Aleshin, V., & Mkrtchyan, G. (2016). Multiple Forms of Glutamate Dehydrogenase in Animals: Structural Determinants and Ph', *Biology*, 5(4), p. 53. doi: 10.3390/biology5040053.

Burki, F. and Kaessmann, H. (2004) 'Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports high neurotransmitter flux', *Nature Genetics*, 36(10), pp. 1061–1063. doi: 10.1038/ng1431.

Busch, S. J. and Sassone-Corsi, P. (1990) 'Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains', *Trends in Genetics*, 6(C), pp. 36–40. doi: 10.1016/0168-9525(90)90071-D.

C.

Calvo, P. and Remunan-Lopez, C. (1997) 'Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers', *Journal of Applied*, pp. 125–132. doi: 10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID

Cantor, J. R. and Sabatini, D. M. (2012) 'Cancer cell metabolism: One hallmark, many faces', *Cancer Discovery*, pp. 881–898. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0345.

Capilla, E. *et al.* (2003) 'Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout', *Regulatory Peptides*, 110(2), pp. 123–132. doi: 10.1016/S0167-0115(02)00212-4.

Capilla, E. *et al.* (2004) 'Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue.', *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 287(2), pp. E348–E357. doi: 10.1152/ajpendo.00538.2003.

Carobbio, S. *et al.* (2009) 'Deletion of Glutamate Dehydrogenase in β -Cells Abolishes Part of the Insulin Secretory Response Not Required for Glucose Homeostasis', *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), pp. 921–929. doi: 10.1074/jbc.M806295200.

Carobbio, S. and Maechler, P. (2004) 'Sustained glucose-stimulated insulin secretion in mouse islets is not culture-dependent', *Diabetologia*, 47(10), pp. 1856–1857. doi: 10.1007/s00125-004-1536-y.

Carr, C. S. and Sharp, P. A. (1990) 'A helix-loop-helix protein related to the immunoglobulin E box-binding proteins.', *Molecular and cellular biology*, 10(8), pp. 4384–4388. doi: 10.1128/MCB.10.8.4384.Updated.

Carthew, R. W., Chodosh, L. A. and Sharp, P. A. (1985) 'An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter', *Cell*, 43(2 PART 1), pp. 439–448. doi: 10.1016/0092-8674(85)90174-6.

Casado, M. *et al.* (1999) 'Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver', *Journal of Biological Chemistry*, 274(4), pp. 2009–2013. doi: 10.1074/jbc.274.4.2009.

Caseras, A. *et al.* (2000) 'Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1493(1–2), pp. 135–141. doi: 10.1016/S0167-4781(00)00173-1.

Caseras, A. *et al.* (2002) 'Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*).', *The British journal of nutrition*, 88(6), pp. 607–614. doi: 10.1079/BJN2002701.

Castaño, G., Nieto, A. and Feliu, J. E. (1979) 'Inactivation of Phosphofruktokinase in Rat Hepatocytes', *The Journal of Chemistry*, 25479(13), pp. 5576–5579.

- Chanda, D. *et al.* (2009) 'Hepatocyte Growth Factor Family Negatively Regulates Hepatic Gluconeogenesis via Induction of Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner in Primary Hepatocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 284(42), pp. 28510–28521. doi: 10.1074/jbc.M109.022244.
- Chokroverty, S. *et al.* (1990) 'Multiple system degeneration with glutamate dehydrogenase deficiency: pathology and biochemistry.', *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 53(12), pp. 1099–101. doi: 10.1136/jnnp.53.12.1099.
- Ciarapica, R. *et al.* (2003) 'Molecular recognition in helix-loop-helix and helix-loop-helix-leucine zipper domains: Design of repertoires and selection of high affinity ligands for natural proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), pp. 12182–12190. doi: 10.1074/jbc.M211991200.
- Colmans, R. F. and Frieden, C. (1966) 'On the Role of Amino Groups in the Structure and Function of Glutamate Dehydrogenase II. Effect of acetylation on molecular properties', *The Journal of Biological Chemistry*, 241(16), pp. 3661–3670.
- Colon, A. D. *et al.* (1986) 'Purification and characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase from rat brain.', *Journal of Neurochemistry*, 46(6), pp. 1811–9.
- Coon, H. *et al.* (2005) 'Upstream stimulatory factor 1 associated with familial combined hyperlipidemia, LDL cholesterol, and triglycerides', *Human Genetics*, 117(5), pp. 444–451. doi: 10.1007/s00439-005-1340-x.
- Corre, S. and Galibert, M. D. (2005) 'Upstream stimulating factors: Highly versatile stress-responsive transcription factors', *Pigment Cell Research*, pp. 337–348. doi: 10.1111/j.1600-0749.2005.00262.x.
- Couée, I. and Tipton, K. F. (1990) 'The inhibition of glutamate dehydrogenase by some antipsychotic drugs.', *Biochemical pharmacology*, 39(5), pp. 827–32.
- Coutinho, F. *et al.* (2015) 'Metabolic responses to dietary protein/carbohydrate ratios in zebra sea bream (*Diplodus cervinus*, Lowe, 1838) juveniles', *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(1), pp. 343–352. doi: 10.1007/s10695-015-0142-x.
- Cowey, C. B. (1995) 'Protein and amino acid requirements: A critique of methods', *Journal of Applied Ichthyology*. Blackwell Publishing Ltd, 11(3–4), pp. 199–204. doi: 10.1111/j.1439-0426.1995.tb00019.x.
- Cowey, C. B. and Knox, D. (2017) 'The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)', *Br. J. Nutr.*, 38. doi: 10.1079/BJN19770111.
- D.**
- Dai, W. *et al.* (2015) 'Amino Acids Attenuate Insulin Action on Gluconeogenesis and Promote Fatty Acid Biosynthesis via mTORC1 Signaling Pathway in trout Hepatocytes', *Cellular Physiology and Biochemistry*. Karger Publishers, 36(3), pp. 1084–1100. doi: 10.1159/000430281.
- Dang, C. V. *et al.* (1992) 'Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins (DNA-protein interaction/transcription)', *Genetics*. National Academy of Sciences, 89(2), pp. 599–602. doi: 10.1073/pnas.89.2.599.
- Dang, C. V. (2012) 'Links between metabolism and cancer', *Genes and Development*, pp. 877–890. doi: 10.1101/gad.189365.112.
- Das, A. T. *et al.* (1993) 'Isolation and characterization of the rat gene encoding glutamate dehydrogenase.', *European journal of biochemistry / FEBS*, 211(3), pp. 795–803.
- Dash, A. B., Orrico, F. C. and Ness, S. A. (1996) 'The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb', *Genes and Development*, 10(15), pp. 1858–1869. doi: 10.1101/gad.10.15.1858.
- Dawson, N. J. and Storey, K. B. (2012) 'An enzymatic bridge between carbohydrate and amino acid metabolism: Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible phosphorylation in a severe hypoxia-tolerant crayfish', *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(3), pp. 331–340. doi: 10.1007/s00360-011-0629-4.

Dini, P. W., Eltman, J. T. and Lipsick, J. S. (1995) 'Mutations in the DNA-binding and transcriptional activation domains of v-Myb cooperate in transformation.', *Journal of virology*, 69(4), pp. 2515–24.

Dolomatov, S. I. *et al.* (2011) 'Features of nitrogen metabolism in fishes', *Rev Fish Biol Fisheries*, 21, pp. 733–737. doi: 10.1007/s11160-011-9212-z.

Drabsch, Y. *et al.* (2007) 'Mechanism of and requirement for estrogen-regulated MYB expression in estrogen-receptor-positive breast cancer cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), pp. 13762–13767. doi: 10.1073/pnas.0700104104.

Drabsch, Y., Ramsay, R. G. and Gonda, T. J. (2010) 'MYB suppresses differentiation and apoptosis of human breast cancer cells', *Breast Cancer Research*, 12(4), p. R55. doi: 10.1186/bcr2614.

Du, J. *et al.* (2011) 'Sirt5 Is an NAD-Dependent Protein Lysine Demalonylase and Desuccinylase'. doi: 10.1126/science.1207861.

Dubendorff, J. W. *et al.* (1992) 'Carboxy-terminal elements of c-Myb negatively regulate transcriptional activation in cis and in trans.', *Genes & development*, 6(12B), pp. 2524–35.

E.

Eames, S. C. *et al.* (2010) 'Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis.', *Zebrafish*, 7(2), pp. 205–13. doi: 10.1089/zeb.2009.0640.

Ekdahl, K. N. and Ekman, P. (1985) 'Fructose-1,6-bisphosphatase from rat liver. A comparison of the kinetics of the unphosphorylated enzyme and the enzyme phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 260(26), pp. 14173–14179. doi: 10.1006/geno.1995.1230.

Elbein, S. C. *et al.* (1999) 'A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians', *Diabetes*, 48(5), pp. 1175–1182. doi: 10.2337/diabetes.48.5.1175.

Enes, P. *et al.* (2006) 'Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles', *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 143(1), pp. 89–96. doi: 10.1016/j.cbpa.2005.10.027.

Enes, P. *et al.* (2009) 'Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish', *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), pp. 519–539. doi: 10.1007/s10695-008-9259-5.

Enes, P. *et al.* (2011) 'Insulin and IGF-I response to a glucose load in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles'. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.02.042.

Engel, P. C. (2014) 'Glutamate dehydrogenases: The why and how of coenzyme specificity', *Neurochemical Research*, pp. 426–432. doi: 10.1007/s11064-013-1089-x.

Engelking, L. R. (2015) 'Textbook of Veterinary Physiological Chemistry', *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, (3), pp. 397–405. doi: 10.1016/B978-0-12-391909-0.50062-1.

EUMOFA (2016) 'European market observatory for fisheries and aquaculture 2016, The EU fish market 2016 Edition, European Commission', *Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries, Director-General (Ed.)*, Brussels, Brussels, p. 86.

F.

Fahien, L. A. and Kmietek, E. (1981) 'Regulation of glutamate dehydrogenase by palmitoyl-coenzyme A.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 212(1), pp. 247–53.

Fahien, L. A. and Shemisa, O. (1970) 'Effects of Chlorpromazine on Glutamate Dehydrogenase', *Molecular Pharmacology*, 6(2).

FAO (2015) 'REGIONAL REVIEW ON STATUS AND TRENDS IN AQUACULTURE DEVELOPMENT IN EUROPE – 2015', *Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ed.)*, Rome, , p. 190.

FAO (2016) 'the State of World Fisheries and Aquaculture 2016', *Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ed.)*. Rome, pp. 190, Rome, , p. 190. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>.

FEAP (2016) 'European Aquaculture Production Report 2007-2015', (October), p. 54.

Fernández, F. *et al.* (2007) 'Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings', *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 343(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.jembe.2006.10.057.

Ferré-D'Amaré, A. R. *et al.* (1994) 'Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF.', *The EMBO journal*, 13(1), pp. 180–9.

Fisher, F. *et al.* (1993) 'Transcription activation by Myc and Max: flanking sequences target activation to a subset of CACGTG motifs in vivo.', *The EMBO journal*, 12(13), pp. 5075–82.

Fisher, H. F. and Mcgregor, L. L. (1961) 'The Mechanism of the Glutamic Dehydrogenase Reaction II. Substrate specificity of the enzyme', *The Journal of Biological Chemistry*, 236(3).

Foos, G., Natour, S. and Klempnauer, K. H. (1993) 'TATA-box dependent trans-activation of the human HSP70 promoter by Myb proteins', *Oncogene*, 8(7), pp. 1775–1782.

French, C. J., Mommsen, T. P. and Hochchka, P. W. (1981) 'Amino Acid Utilisation in Isolated Hepatocytes from Rainbow Trout', *European Journal of Biochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, 113(2), pp. 311–317. doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05068.x.

Frick, N. T. *et al.* (2008) 'Carbohydrate and amino acid metabolism in fasting and aestivating African lungfish (*Protopterus dolloi*)', *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 151(1), pp. 85–92. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.06.003.

Fu, S. L. and Lipsick, J. S. (1996) 'FAETL motif required for leukemic transformation by v-Myb.', *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 70(8), pp. 5600–5610.

Fujimi, T. J. and Aruga, J. (2008) 'Upstream stimulatory factors, USF1 and USF2 are differentially expressed during *Xenopus* embryonic development', *Gene Expression Patterns*, 8(6), pp. 376–381. doi: 10.1016/j.gep.2008.05.003.

G.

Galibert, M. D. *et al.* (1993) 'E-box activator of the C4 promoter is related to but distinct from the transcription factor upstream stimulating factor.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 151(11), pp. 6099–109.

Galibert, M. D. *et al.* (1997) 'Recognition of the E-C4 element from the C4 complement gene promoter by the upstream stimulatory factor-1 transcription factor.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. American Association of Immunologists, 159(12), pp. 6176–83.

Gao, E. *et al.* (1997) 'The basic helix-loop-helix-zipper transcription factor USF1 regulates expression of the surfactant protein-A gene', *Journal of Biological Chemistry*, 272(37), pp. 23398–23406. doi: 10.1074/jbc.272.37.23398.

Ge, Y. *et al.* (2003) 'Physical and Functional Interactions between USF and Sp1 Proteins Regulate Human Deoxycytidine Kinase Promoter Activity', *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), pp. 49901–49910. doi: 10.1074/jbc.M305085200.

George, O. and Ness, S. (2014) 'Situational Awareness: Regulation of the Myb Transcription Factor in Differentiation, the Cell Cycle and Oncogenesis', *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 6(4), pp. 2049–2071. doi: 10.3390/cancers6042049.

Gisbert, E., Sainz, R. D. and Hung, S. S. O. (2003) 'Glycemic responses in white sturgeon after oral administration of graded doses of D-glucose', *Aquaculture*, 224(1–4), pp. 301–312. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00264-3.

Gomez-Requeni, P. *et al.* (2003) 'Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)', *Aquaculture*, 220(1–4), pp. 749–767. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00654-3.

- Gonda, T. J. *et al.* (1987) 'Generation of altered transcripts by retroviral insertion within the c-myc gene in two murine monocytic leukemias.', *Journal of virology*, 61(9), pp. 2754–63.
- Gonda, T. J., Buckmaster, C. and Ramsay, R. G. (1989) 'Activation of c-myc by carboxy-terminal truncation: relationship to transformation of murine haemopoietic cells in vitro', *The EMBO Journal*, 8(1), pp. 777–1783.
- González, J. D. *et al.* (2016) 'Chitosan-Mediated shRNA Knockdown of Cytosolic Alanine Aminotransferase Improves Hepatic Carbohydrate Metabolism', *Marine Biotechnology*, 18(1), pp. 85–97. doi: 10.1007/s10126-015-9670-8.
- Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) 'A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.', *Virology*, 52(2), pp. 456–67.
- Gregor, P. D., Sawadogo, M. and Roeder, R. G. (1990) 'The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4(10), pp. 1730–40. doi: 10.1101/GAD.4.10.1730.
- Groenen, P. M. *et al.* (1996) 'Structure, sequence, and chromosome 19 localization of human USF2 and its rearrangement in a patient with multicystic renal dysplasia', *Genomics*, 38(2), pp. 141–148. doi: 10.1006/geno.1996.0609.
- H.**
- Haigis, M. C. *et al.* (2006) 'SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells', *Cell*, 126(5), pp. 941–954. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.057.
- Hall, J. R. *et al.* (2004) 'Sequence and expression of a constitutive, facilitated glucose transporter (GLUT1) in Atlantic cod *Gadus morhua*.', *The Journal of experimental biology*, 207(Pt 26), pp. 4697–706. doi: 10.1242/jeb.01346.
- Hall, J. R. *et al.* (2005) 'Cloning of GLUT3 cDNA from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and expression of GLUT1 and GLUT3 in response to hypoxia', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1730(3), pp. 245–252. doi: 10.1016/j.bbaexp.2005.07.001.
- Hall, J. R., Short, C. E. and Driedzic, W. R. (2006) 'Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: Developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose.', *The Journal of experimental biology*, 209(Pt 22), pp. 4490–4502. doi: 10.1242/jeb.02532.
- Halver, J. E. and Hardy, R. W. (2002) *Fish Nutrition*, *Journal of Chemical Information and Modeling*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Hamza, M. A. and Engel, P. C. (2008) 'Homotropic allosteric control in clostridial glutamate dehydrogenase: Different mechanisms for glutamate and NAD+?', *FEBS Letters*, 582(13), pp. 1816–1820. doi: 10.1016/j.febslet.2008.04.049.
- Han, S. Y. *et al.* (2001) 'Cell type-dependent regulation of human DNA topoisomerase III alpha gene expression by upstream stimulatory factor 2', *FEBS Lett*, 505(1), pp. 57–62. doi: S0014-5793(01)02777-6 [pii].
- Hardin-Pouzet, H. *et al.* (1996) 'Glucocorticoid upregulation of glutamate dehydrogenase gene expression in vitro in astrocytes', *Brain Res Mol Brain Res*, 37(1–2), pp. 324–328.
- Haschke-Becher E, Kainz A, Bachmann C (2016) Reference values of amino acids and of common clinical chemistry in plasma of healthy infants aged 1 and 4 months. *J Inherit Metab Dis* 39:25–37 . doi: 10.1007/s10545-015-9870-4
- Heflin, L. E. *et al.* (2016) 'Balancing macronutrient intake in cultured *Lytechinus variegatus*', *Aquaculture*, 450, pp. 295–300. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.08.001.
- Heiden Vander, M. G. (2011) 'Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens', *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(9), pp. 671–684. doi: 10.1038/nrd3504.
- Helmreich, E. *et al.* (1954) 'Determination of stationary concentrations of intermediate substances. II. Origin of ketone bodies and their relation to glycolysis.', *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 297(3–6), pp. 113–26.
- Henrion, A. A. *et al.* (1995) 'Structure, sequence, and chromosomal location of the gene for USF2 transcription factors in mouse', *Genomics*, 25(1), pp. 36–43. doi: 10.1016/0888-7543(95)80107-W.

Herrero-Yraola, A. *et al.* (2001) 'Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria', *EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 20(10), pp. 2404–2412. doi: 10.1093/emboj/20.10.2404.

Hillart, G. Vanden and Van Raaij, M. (1995) 'Endogenous fuels; non-invasive versus invasive approaches', *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier, 4(C), pp. 33–63. doi: 10.1016/S1873-0140(06)80006-8.

Hofmann, J. W. *et al.* (2014) 'The effects of aging on the expression of Wnt pathway genes in mouse tissues', *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 36(3), p. 9618. doi: 10.1007/s11357-014-9618-3.

Houlihan, D. F., Mathers, E. and Foster, A. R. (1993) 'Biochemical correlates of growth rate in fish', *Fish Ecophysiology*, (2), pp. 45–70. doi: 10.1007/978-94-011-2304-4_2.

Howcroft, T. K. *et al.* (1999) 'Upstream stimulatory factor regulates major histocompatibility complex class I gene expression: the U2DeltaE4 splice variant abrogates E-box activity.', *Molecular and cellular biology*, 19(7), pp. 4788–97.

Hudson, R. C. and Daniel, R. M. (1993) 'l-glutamate dehydrogenases: Distribution, properties and mechanism', *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Physiology*, pp. 767–792. doi: 10.1016/0305-0491(93)90031-Y.

Hussain, M. M., Zanniss, V. I. and Plaitakis, A. (1969) 'Characterization of Glutamate Dehydrogenase Isoproteins Purified from the Cerebellum of Normal Subjects and Patients with Degenerative Neurological Disorders, and from Human Neoplastic Cell Lines', *The Journal of Biological Chemistry*, 244(34), pp. 20730–20735.

I.

IFFO (2013) 'IFFO Positional Statement'. Available at: http://www.iffo.net/system/files/Is_aquaculture_growth_putting_pressure_on_feed_fish_stocks_FINAL_Feb_2013_formatted_1.pdf.

Ince, B. W. and Thorpe, A. (1977) 'Glucose and amino acid-stimulated insulin release in vivo in the European silver eel (*Anguilla anguilla* L.)', *General and Comparative Endocrinology*. Academic Press, 31(2), pp. 249–256. doi: 10.1016/0016-6480(77)90024-7.

Iynedjian, P. B. (1998) 'Identification of upstream stimulatory factor as transcriptional activator of the liver promoter of the glucokinase gene.', *The Biochemical journal*, 333 (Pt 3, pp. 705–12.

Iynedjian, P. B. (2009) 'Molecular physiology of mammalian glucokinase', *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 27–42. doi: 10.1007/s00018-008-8322-9.

J.

Jarzyna, R., Lietz, T. and Bryla, J. (1994) 'Effect of polyamines on glutamate dehydrogenase within permeabilized kidney-cortex mitochondria and isolated renal tubules of rabbit', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier, 47(8), pp. 1387–1393. doi: 10.1016/0006-2952(94)90338-7.

Jin, L. *et al.* (2015) 'Glutamate Dehydrogenase 1 Signals through Antioxidant Glutathione Peroxidase 1 to Regulate Redox Homeostasis and Tumor Growth', *Cancer Cell*, 27(2), pp. 257–270. doi: 10.1016/j.ccell.2014.12.006.

Jobling, M. (2011) 'National Research Council (NRC): Nutrient requirements of fish and shrimp', *Aquaculture International*, 20(3), pp. 601–602. doi: 10.1007/s10499-011-9480-6.

Jürss, K., Bastrop, R. and Jurss, K. (1995) 'Amino acid metabolism in fish', *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier, 4(4), p. 31. doi: 10.1016/S1873-0140(06)80010-X.

K.

Kader, M. A. *et al.* (2012) 'Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red sea bream, *Pagrus major*', *Aquaculture*, 350–353, pp. 109–116. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.04.009.

- Kaiser, S. *et al.* (1992) 'Effect of altered acid-base balance and of various agonists on levels of renal glutamate dehydrogenase mRNA.', *The American journal of physiology*, 262(3 Pt 2), pp. F507-12.
- Kalamam, B. S. *et al.* (2012) 'Regulation of metabolism by dietary carbohydrates in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content.', *The Journal of experimental biology*, 215(Pt 15), pp. 2567-78. doi: 10.1242/jeb.070581.
- Kanavouras, K. *et al.* (2007) 'Properties and molecular evolution of humanGLUD2 (neural and testicular tissue-specific) glutamate dehydrogenase', *Journal of Neuroscience Research*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 85(15), pp. 3398-3406. doi: 10.1002/jnr.21576.
- Kanei-Ishii, C. *et al.* (1994) 'c-Myb-induced trans-activation mediated by heat shock elements without sequence-specific DNA binding of c-Myb', *Journal of Biological Chemistry*, 269(22), pp. 15768-15775.
- Karaca, M. *et al.* (2015) 'GDH-Dependent Glutamate Oxidation in the Brain Dictates Peripheral Energy Substrate Distribution', *Cell Reports*, 13(2), pp. 365-375. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.003.
- Karapanagiotidis, I. T. (2014) 'The Re-Authorization of Non-Ruminant Processed Animal Proteins in European Aqua feeds', *Fisheries and Aquaculture Journal*, 5(4). doi: 10.4172/2150-3508.10000e111.
- Kaulen, H. *et al.* (1991) 'The Xenopus B1 factor is closely related to the mammalian activator USF and is implicated in the developmental regulation of TFIIIA gene expression.', *Molecular and cellular biology*, 11(1), pp. 412-24.
- Kaushik, S. J. and Seiliez, I. (2010) 'Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: Current knowledge and future needs', *Aquaculture Research*, 41(3), pp. 322-332. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02174.x.
- Kirschbaum, B. J., Pognonec, P. and Roeder, R. G. (1992) 'Definition of the transcriptional activation domain of recombinant 43-kilodalton USF.', *Molecular and cellular biology*, 12, pp. 5094-5101. doi: 10.1128/MCB.12.11.5094.
- Kolodziejka, K. M. *et al.* (2008) 'c-Myb-dependent smooth muscle cell differentiation', *Circulation Research*, 102(5), pp. 554-561. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.105.162628.
- Kophengnavong, T., Michnowicz, J. E. and Blackwell, T. K. (2000) 'Establishment of distinct MyoD, E2A, and twist DNA binding specificities by different basic region-DNA conformations', *Mol Cell Biol*, 20(1), pp. 261-272. doi: 10.1128/MCB.20.1.261-272.2000.
- Kozak, M. (2002) 'Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation', *Gene*, pp. 1-34. doi: 10.1016/S0378-1119(02)01056-9.
- Kozłowski, M. T. *et al.* (1991) 'Sea urchin USF: A helix-loop-helix protein active in embryonic ectoderm cells', *Developmental Biology*. Academic Press, 148(2), pp. 625-630. doi: 10.1016/0012-1606(91)90280-G.
- L.**
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.', *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.
- Lai, J. C. *et al.* (1986) 'The subcellular localization of glutamate dehydrogenase (GDH): is GDH a marker for mitochondria in brain?', *Neurochemical research*, 11(5), pp. 733-44.
- Lansard, M. *et al.* (2011) 'L-Leucine, L-Methionine, and L-Lysine Are Involved in the Regulation of Intermediary Metabolism-Related Gene Expression in Rainbow Trout Hepatocytes', *Journal of Nutrition*. American Society for Nutrition, 141(1), pp. 75-80. doi: 10.3945/jn.110.124511.
- Leaver, M. (2008) 'Towards Fish Lipid Nutrigenomics: Current State and Prospects for Fin-Fish ; José M. Bautista b Aquaculture', *Reviews in Fisheries Science*, 16, pp. 71-82. doi: 10.1080/10641260802325278.
- Lee, C. Y. (1982) 'Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from Mouse', *Methods in Enzymology*, 89(C), pp. 252-257. doi: 10.1016/S0076-6879(82)89045-9.
- Lee, W. K. *et al.* (1999) 'Purification and characterization of glutamate dehydrogenase as another isoprotein binding to the membrane of rough endoplasmic reticulum.', *Journal of cellular biochemistry*, 76(2), pp. 244-53.

- Lefrançois-Martinez, A. M. *et al.* (1995) 'Upstream stimulatory factor proteins are major components of the glucose response complex of the L-type pyruvate kinase gene promoter.', *The Journal of biological chemistry*, 270(6), pp. 2640–3.
- Lehmkoetter (2013) 'A bright future for fish farming', *World ocean review, Aquaculture*, Chapter 4, pp. 80–93.
- Lei, W. *et al.* (2004) 'Positive and Negative Determinants of Target Gene Specificity in Myb Transcription Factors', *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), pp. 29519–29527. doi: 10.1074/jbc.M403133200.
- Levenson, J. D. and Ness, S. A. (1998) 'Point mutations in v-Myb disrupt a cyclophilin-catalyzed negative regulatory mechanism.', *Molecular cell*, 1(2), pp. 203–11. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80021-0.
- Li, C. *et al.* (2006) 'Green tea polyphenols modulate insulin secretion by inhibiting glutamate dehydrogenase', *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), pp. 10214–10221. doi: 10.1074/jbc.M512792200.
- Li, M., Li, C., Allen, A., Stanley, C. A., *et al.* (2012) 'The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, pp. 69–80. doi: 10.1016/j.abb.2011.10.015.
- Li, M., Li, C., Allen, A., Stanley, C. A., *et al.* (2012) 'The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. NIH Public Access, pp. 69–80. doi: 10.1016/j.abb.2011.10.015.
- Li, M. *et al.* (2014) 'Glutamate dehydrogenase: Structure, allosteric regulation, and role in insulin homeostasis', *Neurochemical Research*, pp. 433–445. doi: 10.1007/s11064-013-1173-2.
- Li, P. *et al.* (2009) 'New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds', *Amino Acids*, pp. 43–53. doi: 10.1007/s00726-008-0171-1.
- Lightfoot, D. A., Green, N. K. and Cullimore, J. V. (1988) 'The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts.', *Plant molecular biology*, 11(2), pp. 191–202. doi: 10.1007/BF00015671.
- Lin, Q., Luo, X. and Sawadogo, M. (1994) 'Archaic structure of the gene encoding transcription factor USF.', *The Journal of biological chemistry*, 269(39), pp. 23894–903.
- Liu, F. *et al.* (2006) 'Oncogenic mutations cause dramatic, qualitative changes in the transcriptional activity of c-Myb.', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 25(5), pp. 795–805. doi: 10.1038/sj.onc.1209105.
- Liu, Z. *et al.* (2012) 'Characterization and dietary regulation of oligopeptide transporter (PepT1) in different ploidy fishes', *Peptides*, 52(6), pp. 149–156. doi: 10.1016/j.peptides.2013.12.017.
- Lombard, D. B. *et al.* (2007) 'Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology, 27, pp. 8807–14. doi: 10.1128/MCB.01636-07.
- Londesborough, J. C. and Dalziel, K. (1968) 'The equilibrium constant of the isocitrate dehydrogenase reaction.', *The Biochemical journal*. Portland Press Ltd, 110(2), pp. 217–22.
- Lu, B. C. *et al.* (2009) 'Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis', *Nature Genetics*, 41(12), pp. 1295–1302. doi: 10.1038/ng.476.
- Luo, X. and Sawadogo, M. (1996) 'Functional domains of the transcription factor USF2: atypical nuclear localization signals and context-dependent transcriptional activation domains.', *Molecular and cellular biology*, 16, pp. 1367–75.
- Lushchak, V. I., Husak, V. V. and Storey, K. B. (2008) 'Regulation of AMP-deaminase activity from white muscle of common carp *Cyprinus carpio*', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(2), pp. 362–369. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.10.008.

M.

- Malaterre, J. *et al.* (2008) 'c-Myb Is Required for Neural Progenitor Cell Proliferation and Maintenance of the Neural Stem Cell Niche in Adult Brain', *Stem Cells*, 26(1), pp. 173–181. doi: 10.1634/stemcells.2007-0293.

- Marandel, L. *et al.* (2017) 'A reassessment of the carnivorous status of salmonids: Hepatic glucokinase is expressed in wild fish in Kerguelen Islands', *Science of the Total Environment*, 612, pp. 276–285. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.247.
- Martin, C. C. *et al.* (2003) 'Upstream stimulatory factor (USF) and neurogenic differentiation/beta-cell E box transactivator 2 (NeuroD/BETA2) contribute to islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic-subunit-related protein (IGRP) gene expression.', *The Biochemical journal*, 371(Pt 3), pp. 675–86. doi: 10.1042/BJ20021585.
- Martius, C. and Lynen, F. (1950) '[Problem of the citric acid cycle].', *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*, 10, pp. 167–222.
- Mastorodemos, V. *et al.* (2005) 'Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands', in *Journal of Neuroscience Research*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, pp. 65–73. doi: 10.1002/jnr.20353.
- Matsukawa, T. *et al.* (2001) 'Up-Regulation of Upstream Stimulatory Factors by Protein Malnutrition and Its Possible Role in Regulation of the IGF-Binding Protein-1 Gene', *Endocrinology*, 142(11):46(142(11):4643–4651).
- Mavrothalassitis, G. *et al.* (1988) 'Isolation and characterization of cDNA clones encoding human liver glutamate dehydrogenase: Evidence for a small gene family (synthetic oligonucleotide library screening/genomic hybridization/RNA hybridization)', *Genetics*, 85, pp. 3494–3498.
- McMahon, K. W. *et al.* (2010) 'Carbon isotope fractionation of amino acids in fish muscle reflects biosynthesis and isotopic routing from dietary protein', *Journal of Animal Ecology*. Blackwell Publishing Ltd, 79(5), pp. 1132–1141. doi: 10.1111/j.1365-2656.2010.01722.x.
- Metón, I. *et al.* (2000) '6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression is regulated by diet composition and ration size in liver of gilthead sea bream, *Sparus aurata*', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1491(1–3), pp. 220–228. doi: 10.1016/S0167-4781(00)00040-3.
- Metón, I. *et al.* (2004) 'Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 138(2), pp. 145–153. doi: 10.1016/j.cbpc.2004.03.004.
- Michaelidis, T. M. *et al.* (1993) 'The Human Glutamate Dehydrogenase Gene Family: Gene Organization and Structural Characterization', *Genomics*, 16(1), pp. 150–160. doi: 10.1006/geno.1993.1152.
- Mommsen, T. P., French, C. J. and Hochachka, P. W. (1980) 'Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon', *Canadian Journal of Zoology*. NRC Research Press Ottawa, Canada, 58(10), pp. 1785–1799. doi: 10.1139/z80-246.
- Moon, T. W. (2001) 'Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction?', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2–3), pp. 243–249. doi: 10.1016/S1096-4959(01)00316-5.
- Moraes, G. and Polez, V. L. P. (2004) 'Ureotelism is inducible in the neotropical freshwater Hoplias malabaricus (Teleostei, Erythrinidae).', *Brazilian journal of biology*, 64(2), pp. 265–271. doi: 10.1590/S1519-69842004000200012.
- Moreira, I. S. *et al.* (2008) 'Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles', *Aquaculture*, 274(1), pp. 153–160. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.016.
- Morrison, T. B., Weis, J. J. and Wittwer, C. T. (1998) 'Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.', *BioTechniques*, 24(6), pp. 954–8, 960, 962.
- Moyano, F. .. Cardenete, G. and De la Higuera, M. (1991) 'Nutritive and metabolic utilization of proteins with high glutamic acid content by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. Pergamon, 100(3), pp. 759–762. doi: 10.1016/0300-9629(91)90404-Z.
- Msdaniel, H. G. (1995) 'Comparison of the Primary Structure of Nuclear and Mitochondrial Glutamate-Dehydrogenase from Bovine Liver', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press, 319(1), pp. 316–321. doi: 10.1006/ABBI.1995.1299.

- Mucenski, M. L. *et al.* (1991) 'A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis.', *Cell*, 65(4), pp. 677–89.
- Müller, C. *et al.* (1999) 'c-myb transactivates the human cyclin A1 promoter and induces cyclin A1 gene expression.', *Blood*, 94(12), pp. 4255–62.
- Murai, T. and Ogata, H. (1990) 'Changes in free amino acid levels in various tissues of common carp in response to insulin injection followed by force-feeding an amino acid diet.', *The Journal of nutrition*. American Society for Nutrition, 120(7), pp. 711–718.
- Murre, C. *et al.* (1989) 'Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence.', *Cell*, 58(3), pp. 537–44.
- Nakata, Y. *et al.* (2007) 'c-Myb Contributes to G₂/M Cell Cycle Transition in Human Hematopoietic Cells by Direct Regulation of Cyclin B1 Expression', *Molecular and Cellular Biology*, 27(6), pp. 2048–2058. doi: 10.1128/MCB.01100-06.
- N.**
- Natale, F. *et al.* (2013) 'Interactions between aquaculture and fisheries', *Marine Policy*, 38, pp. 205–213. doi: 10.1016/j.marpol.2012.05.037.
- Navarro, I. *et al.* (2002) 'Insights into Insulin and Glucagon Responses in Fish: Fish Growth and Metabolism. Environmental', *Fish Physiology and Biochemistry* 27:, 27(2), pp. 205–216. doi: 10.1023/B.
- Ness, S. A. (1996) 'The Myb oncoprotein: regulating a regulator.', *Biochimica et biophysica acta*, 1288(3), pp. F123–39.
- Nimesh, S. *et al.* (2010) 'Enhanced Gene Delivery Mediated by Low Molecular Weight Chitosan/DNA Complexes: Effect of pH and Serum', *Molecular Biotechnology*, 46(2), pp. 182–196. doi: 10.1007/s12033-010-9286-1.
- Nissen, J. D. *et al.* (2015) 'Dysfunctional TCA-Cycle Metabolism in Glutamate Dehydrogenase Deficient Astrocytes', *Glia*, 63(12), pp. 2313–2326. doi: 10.1002/glia.22895.
- Nissen, J. D. *et al.* (2017) 'Expression of the human isoform of glutamate dehydrogenase, hGDH2, augments TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate during glucose deprivation in astrocytes', *Glia*, 65(3), pp. 474–488. doi: 10.1002/glia.23105.
- Nogueira, N. *et al.* (2012) 'Inclusion of low levels of blood and feathermeal in practical diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*)', *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(3), pp. 641–651. doi: 10.4194/1303-2712-v12_3_12.
- Nordlie, R. C., Foster, J. D. and Lange, A. J. (1999) 'Regulation of glucose production by the liver', *Annual Review of Nutrition*, 19(1), pp. 379–406. doi: 10.1146/annurev.nutr.19.1.379.
- O.**
- Oh, I.-H. and Reddy, E. P. (1999) 'The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 18(19), pp. 3017–3033. doi: 10.1038/sj.onc.1202839.
- Ohkubo, N. and Matsubara, T. (2002) 'Sequential utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of barfin flounder *Verasper moseri*', *Marine Biology*, 140(1), pp. 187–196. doi: 10.1007/s002270100647.
- Oliva-Teles, A., Enes, P. and Peres, H. (2015) *Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish, Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-08-100506-4.00008-8.
- Olsen, R. L. and Hasan, M. R. (2012) 'A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production', *Trends in Food Science and Technology*, pp. 120–128. doi: 10.1016/j.tifs.2012.06.003.

P.

- Pajęcka, K. *et al.* (2015) 'Glucose replaces glutamate as energy substrate to fuel glutamate uptake in glutamate dehydrogenase-deficient astrocytes', *Journal of Neuroscience Research*, 93(7), pp. 1093–1100. doi: 10.1002/jnr.23568.
- Pajukanta, P. *et al.* (2004) 'Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1).', *Nature genetics*, 36(4), pp. 371–376. doi: 10.1038/ng1320.
- Pani, E. *et al.* (2008) 'Pin1 interacts with c-Myb in a phosphorylation-dependent manner and regulates its transactivation activity', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1783(6), pp. 1121–1128. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.02.020.
- Panserat *et al.* (2001) 'Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *Journal of Experimental Biology [J Exp Biol]*, 204(2), pp. 359–365.
- Panserat, S. *et al.* (2000) 'Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 278(5), pp. R1164–R1170.
- Panserat, S. *et al.* (2000) 'Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)¹¹The Genbank accession number for the rainbow trout G6Pase sequence is AF120150.', *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(1), pp. 22–29. doi: 10.1016/S0955-2863(99)00067-4.
- Panserat, S. *et al.* (2001) 'Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 128(2), pp. 275–283. doi: 10.1016/S1096-4959(00)00322-5.
- Panserat, S., Rideau, N. and Polakof, S. (2014) 'Nutritional regulation of glucokinase: a cross-species story', *Nutrition Research Reviews*, 27(1), pp. 21–47. doi: 10.1017/S0954422414000018.
- Panserat, Plagnes-Juan, E. and Kaushik, S. (2001) 'Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).', *The Journal of experimental biology*, 204(Pt 13), pp. 2351–60.
- Panserat, Plagnes-Juan, E. and Kaushik, S. (2002) 'Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*).', *Biochimica et biophysica acta*, 1579(1), pp. 35–42. doi: 10.1016/S0167-4781(02)00501-8.
- Park, J. *et al.* (2013) 'SIRT5-Mediated Lysine Desuccinylation Impacts Diverse Metabolic Pathways', *Molecular Cell*, 50, pp. 919–930. doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.001.
- Park, S. *et al.* (2012) 'Gene trapping uncovers sex-specific mechanisms for upstream stimulatory factors 1 and 2 in angiotensinogen expression', *Hypertension*, 59(6), pp. 1212–1219. doi: 10.1161/hypertensionaha.112.192971.
- Paulauskis, J. D. and Sul, H. S. (1989) 'Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver.', *The Journal of biological chemistry*, 264(1), pp. 574–577.
- Pawlus, M. R. *et al.* (2012) 'Upstream Stimulatory Factor 2 and Hypoxia-Inducible Factor 2 (HIF2) Cooperatively Activate HIF2 Target Genes during Hypoxia', *Molecular and Cellular Biology*, 32(22), pp. 4595–4610. doi: 10.1128/MCB.00724-12.
- Peng, C. *et al.* (2011) 'The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 10(12), p. M111.012658. doi: 10.1074/mcp.M111.012658.
- Peres, H. and Oliva-Teles, A. (2005) 'The effect of dietary protein replacement by crystalline amino acid on growth and nitrogen utilization of turbot *Scophthalmus maximus* juveniles', *Aquaculture*, 250(3–4), pp. 755–764. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.04.046.

- Peres, H. and Oliva-Teles, A. (2006) 'Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)', *Aquaculture*, 256(1-4), pp. 395-402. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.02.010.
- Peres, H. and Oliva-Teles, A. (2007) 'Effect of the dietary essential amino acid pattern on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)', *Aquaculture*, 267(1-4), pp. 119-128. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.010.
- Pérez-de la Mora, M. *et al.* (1989) 'A glutamate dehydrogenase-based method for the assay of l-glutamic acid: Formation of pyridine nucleotide fluorescent derivatives', *Analytical Biochemistry*. Academic Press, 180(2), pp. 248-252. doi: 10.1016/0003-2697(89)90425-9.
- Pérez-Jiménez, A. *et al.* (2007) 'Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition', *Aquaculture*. Elsevier, 265(1-4), pp. 325-335. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.021.
- Pérez-Jiménez, A. *et al.* (2012) 'Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding', *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(4), pp. 1145-1157. doi: 10.1007/s10695-011-9600-2.
- Peterson, P. E. and Smith, T. J. (1999) 'The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery', *Structure*, 7(7), pp. 769-782. doi: 10.1016/S0969-2126(99)80101-4.
- Plaitakis, A. *et al.* (2017a) 'The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease', *Biology*, 6(1), p. 11. doi: 10.3390/biology6010011.
- Plaitakis, A. *et al.* (2017b) 'The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease', *Biology*, 6(1), p. 11. doi: 10.3390/biology6010011.
- Plaitakis, A., Berl, S. and Yahr, M. D. (1984) 'Neurological disorders associated with deficiency of glutamate dehydrogenase', *Annals of Neurology*, 15(2), pp. 144-153. doi: 10.1002/ana.410150206.
- Plaitakis, A., Latsoudis, H. and Spanaki, C. (2011) 'The human GLUD2 glutamate dehydrogenase and its regulation in health and disease', *Neurochemistry International*, 59, pp. 495-509. doi: 10.1016/j.neuint.2011.03.015.
- Plaitakis, A., Metaxari, M. and Shashidharan, P. (2000) 'Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: Implications for biologic function', *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Science Ltd., 75(5), pp. 1862-1869. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0751862.x.
- Plisetskaya, E. M. *et al.* (1991) 'Effects of injected and dietary arginine on plasma insulin levels and growth of pacific salmon and rainbow trout', *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology*. Pergamon, 98(1), pp. 165-170. doi: 10.1016/0300-9629(91)90595-4.
- Plisetskaya, E. M. (1998) 'Some of my not so favorite things about insulin and insulin-like growth factors in fish', in *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 3-11. doi: 10.1016/S0305-0491(98)10107-4.
- Pognonec, P. *et al.* (1997) 'Cross-family interaction between the bHLHZip USF and bZip Fra1 proteins results in down-regulation of AP1 activity.', *Oncogene*, 14(17), pp. 2091-8. doi: 10.1038/sj.onc.1201046.
- Polakof, S. *et al.* (2012) 'Glucose metabolism in fish: a review', *Journal of Comparative Physiology B*, 182(8), pp. 1015-1045. doi: 10.1007/s00360-012-0658-7.
- Polakof, S., Míguez, J. M. and Soengas, J. L. (2007) 'Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: Dependence on feeding', *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(2), pp. 363-374. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.01.009.
- Polakof, S. and Soengas, J. L. (2013) 'Evidence of sugar sensitive genes in the gut of a carnivorous fish species', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 166(1), pp. 58-64. doi: 10.1016/j.cbpb.2013.07.003.
- Polez, V. L. P., Moraes, G. and Santos Neto, C. (2003) 'Different biochemical strategies of two Neotropical fish to cope with the impairment of nitrogen excretion during air exposure', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, pp. 279-285. doi: 10.1590/S0100-879X2003000200017.

Poll van de, M. C. G. *et al.* (2004) 'Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange.', *The American journal of clinical nutrition*. American Society for Nutrition, 79(2), pp. 185–97.

Prisco, G. Di, Banay-Schwartz, M. and Strecker, H. (1968) 'Glutamate dehydrogenase in nuclear and mitochondrial fractions of rat liver', *Biochemical and biophysical research communications*. Academic Press, 33(4), pp. 606–612. doi: 10.1016/0006-291X(68)90339-2.

Prisco di, G. and Casola, L. (1975) 'Detection of structural differences between nuclear and mitochondrial glutamate dehydrogenases by the use of immunoabsorbents.', *Biochemistry*, 14(21), pp. 4679–83.

Purohit, J. S. *et al.* (2013) 'Chicken liver glutamate dehydrogenase (GDH) demonstrates a histone H3 specific protease (H3ase) activity in vitro', *Biochimie*. Elsevier Masson, 95(11), pp. 1999–2009. doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.005.

Putt, W. *et al.* (2004) 'Variation in USF1 shows haplotype effects, gene:gene and gene:environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II', *Human Molecular Genetics*, 13(15), pp. 1587–1597. doi: 10.1093/hmg/ddh168.

Q.

Quintana, A. M. *et al.* (2011) 'Identification and regulation of c-Myb target genes in MCF-7 cells.', *BMC cancer*. BioMed Central, 11, p. 30. doi: 10.1186/1471-2407-11-30.

Qyang, Y. *et al.* (1999) 'Cell-Type-Dependent Activity of the Ubiquitous Transcription Factor USF in Cellular Proliferation and Transcriptional Activation', *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), pp. 1508–1517. doi: 10.1128/MCB.19.2.1508.

R.

Rajas, F., Gire, V. and Rousset, B. (1996) 'Involvement of a membrane-bound form of glutamate dehydrogenase in the association of lysosomes to microtubules', *Journal of Biological Chemistry*, 271(47), pp. 29882–29890. doi: 10.1074/jbc.271.47.29882.

Ramsay, R. G. and Gonda, T. J. (2008) 'MYB function in normal and cancer cells', *Nature Reviews Cancer*, 8(7), pp. 523–534. doi: 10.1038/nrc2439.

Randall, D. J. and Ip, Y. K. (2006) 'Ammonia as a respiratory gas in water and air-breathing fishes', *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 154, pp. 216–225. doi: 10.1016/j.resp.2006.04.003.

Read, M. L., Clark, A. R. and Docherty, K. (1993) 'The helix-loop-helix transcription factor USF (upstream stimulating factor) binds to a regulatory sequence of the human insulin gene enhancer', *Biochem J*, 295 (Pt 1), pp. 233–237.

Richardson, S. C. W., Kolbe, H. V. J. and Duncan, R. (1999) 'Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: Biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA', *International Journal of Pharmaceutics*, 178(2), pp. 231–243. doi: 10.1016/S0378-5173(98)00378-0.

Rito, J. *et al.* (2017) 'Evidence of extensive plasma glucose recycling following a glucose load in seabass', *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 211, pp. 41–48. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.05.009.

Rodríguez, C. I., Gironès, N. and Fresno, M. (2003) 'Cha, a basic helix-loop-helix transcription factor involved in the regulation of upstream stimulatory factor activity.', *The Journal of biological chemistry*, 278(44), pp. 43135–45. doi: 10.1074/jbc.M300053200.

Rolland, M. *et al.* (2016) 'Increasing levels of dietary crystalline methionine affect plasma methionine profiles, ammonia excretion, and the expression of genes related to the hepatic intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 198, pp. 91–99. doi: 10.1016/j.cbpb.2016.04.006.

Ronner, P. and Scarpa, A. (1987) 'Secretagogues for pancreatic hormone release in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*).', *Gen Comp Endocrinol* 65: 354-62. Academic Press, 65(3), pp. 354–362. doi: 10.1016/0016-6480(87)90120-1.

Roth, U., Jungermann, K. and Kietzmann, T. (2004) 'Modulation of glucokinase expression by hypoxia-inducible factor 1 and upstream stimulatory factor 2 in primary rat hepatocytes', *Biological chemistry*, 385(3–4), pp. 239–247. doi: 10.1515/BC.2004.018.

Rothe, F., Brosz, M. and Storm-Mathisen, J. (1995) 'Quantitative ultrastructural localization of glutamate dehydrogenase in the rat cerebellar cortex', *Neuroscience*, 64(4), pp. iii–xvi.

Ruderman, N. B. (1975) 'Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis', *Annual Review of Medicine*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 26(11), pp. 245–258. doi: 10.1146/annurev.me.26.020175.001333.

Rushton, J. *et al.* (2003) 'Distinct changes in gene expression induced by A-Myb, B-Myb and c-Myb proteins', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 22(2), pp. 308–13. doi: 10.1038/sj.onc.

S.

Sáez, M. I. *et al.* (2017) 'Comparison of lacZ reporter gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following oral or intramuscular administration of plasmid DNA in chitosan nanoparticles', *Aquaculture*, 474(474), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.03.023.

Saha, N. and Ratha, B. K. (1998) 'Ureogenesis in Indian air-breathing teleosts: adaptation to environmental constraints', *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120, pp. 195–208.

Saiki, R. *et al.* (1988) 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase', *Science*, 239(4839), pp. 487–491. doi: 10.1126/science.2448875.

Saito, T. *et al.* (2003) 'Cloning and characterization of a novel splicing isoform of USF1.', *International journal of molecular medicine*, 12(2), pp. 161–7.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual, 3ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez-Muros, M. J. *et al.* (1998) 'Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30(1), pp. 55–63. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00100-3.

Sandelin, A. (2004) 'JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles', *Nucleic Acids Research*, 32(90001), p. 91D–94. doi: 10.1093/nar/gkh012.

Sawadogo, M. *et al.* (1988) 'Multiple Forms of the Human Gene-specific Transcription Factor USF I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei', *The Journal of Biological Chemistry*, 263(24), pp. 11985–11993.

Sawadogo, M. and Roeder, R. G. (1985) 'Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region', *Cell*. Elsevier, 43(1), pp. 165–175. doi: 10.1016/0092-8674(85)90021-2.

Schaefer, B. C. (1995) 'Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: New Strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning of Full-Length cDNA Ends', *Analytical Biochemistry*, 227(2), pp. 255–273. doi: 10.1006/abio.1995.1279.

Schatzlein, A. G. *et al.* (2005) 'Preferential liver gene expression with polypropylenimine dendrimers', in *Journal of Controlled Release*, pp. 247–258. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.08.024.

Schlicker, C. *et al.* (2008) 'Substrates and Regulation Mechanisms for the Human Mitochondrial Sirtuins Sirt3 and Sirt5', *Journal of Molecular Biology*, 382(3), pp. 790–801. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.048.

Seilliez, I. *et al.* (2011) 'Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 300(3), pp. R733-43. doi: 10.1152/ajpregu.00579.2010.

- Sener, A. and Malaisse, W. J. (1980) 'L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase.', *Nature*, pp. 187–189. doi: 10.1038/288187a0.
- Sha, M. *et al.* (1995) 'Anti-cooperative biphasic equilibrium binding of transcription factor upstream stimulatory factor to its cognate DNA monitored by protein fluorescence changes', *Journal of Biological Chemistry*, 270(33), pp. 19325–19329. doi: 10.1074/jbc.270.33.19325.
- Shashidharan, P. *et al.* (1994) 'Novel human glutamate dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an X-linked intronless gene', *Journal of Biological Chemistry*, 269(24), pp. 16971–16976.
- Shashidharan, P. *et al.* (2002) 'Nerve Tissue-Specific Human Glutamate Dehydrogenase that Is Thermolabile and Highly Regulated by ADP', *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Science Ltd, 68(5), pp. 1804–1811. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68051804.x.
- Shi, L. *et al.* (2008) 'High glucose levels upregulate upstream stimulatory factor 2 gene transcription in mesangial cells', *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(6), pp. 1952–1961. doi: 10.1002/jcb.21585.
- Shieh, B. H. *et al.* (1993) 'Localization of the gene-encoding upstream stimulatory factor (USF) to human chromosome 1q22-q23.', *Genomics*, pp. 266–8. doi: 10.1006/geno.1993.1174.
- Shih, H. and Towle, H. C. (1994) 'Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Context of the CACGTG motif determines the specificity of carbohydrate regulation.', *The Journal of biological chemistry*, 269(12), pp. 9380–7.
- Shimeno, S. and Agriculture, F. (1994) 'Effects of Dietary Activities and Body Glucose, Fructose, and Composition in Carp Galactose on Hepatopancreatic Enzyme Takafumi', *Fisheries Science*, 60(5), pp. 613–617.
- Shin, D. H. *et al.* (1991) 'Transcriptional regulation of p90 with sequence homology to Escherichia coli glycerol-3-phosphate acyltransferase', *Journal of Biological Chemistry*, 266(35), pp. 23834–23839.
- Sirito *et al.* (1998) 'Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), pp. 3758–3763. doi: 10.1073/pnas.95.7.3758.
- Sirito, M. *et al.* (1992) 'Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers.', *Gene expression*, 2(3), pp. 231–40.
- Sirito, M. *et al.* (1994) 'Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells', *Nucleic Acids Research*, 22(3), pp. 427–433. doi: 10.1093/nar/22.3.427.
- Smale, S. T. and Baltimore, D. (1989) 'The "initiator" as a transcription control element', *Cell*. Elsevier, 57(1), pp. 103–113. doi: 10.1016/0092-8674(89)90176-1.
- Smith, T. J. and Stanley, C. A. (2008) 'Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier, pp. 557–564. doi: 10.1016/j.tibs.2008.07.007.
- Soengas, J. L. *et al.* (2006) 'Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding', *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(3), pp. R810–R821. doi: 10.1152/ajpregu.00115.2006.
- Soengas, J. L. (2014) 'Contribution of glucose- and fatty acid sensing systems to the regulation of food intake in fish: A review', *General and Comparative Endocrinology*, 205, pp. 36–48. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.01.015.
- Spanaki, C. *et al.* (2012) 'The complex regulation of human *glud1* and *glud2* glutamate dehydrogenases and its implications in nerve tissue biology', *Neurochemistry International*, 61(4), pp. 470–481. doi: 10.1016/j.neuint.2012.05.020.
- Spanaki, C. *et al.* (2014) 'Heterogeneous cellular distribution of glutamate dehydrogenase in brain and in non-neural tissues', *Neurochemical Research*. Springer US, pp. 500–515. doi: 10.1007/s11064-013-1235-5.
- Spanaki, C., Kotzamani, D. and Plaitakis, A. (2017) 'Widening Spectrum of Cellular and Subcellular Expression of Human *GLUD1* and *GLUD2* Glutamate Dehydrogenases Suggests Novel Functions', *Neurochemical Research*. Springer US, 42(1), pp. 92–107. doi: 10.1007/s11064-016-1986-x.

- Spanaki, C. and Plaitakis, A. (2012) 'The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism', *Neurotoxicity Research*, pp. 117–127. doi: 10.1007/s12640-011-9285-4.
- Spohrer, S. *et al.* (2016) 'The nuclear fraction of protein kinase CK2 binds to the upstream stimulatory factors (USFs) in the absence of DNA', *Cellular Signalling*, Pergamon, 28(2), pp. 23–31. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.11.007.
- Srivastava, S. K. *et al.* (2012) 'Myb overexpression overrides androgen depletion-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells, and confers aggressive malignant traits: Potential role in castration resistance', *Carcinogenesis*, 33(6), pp. 1149–1157. doi: 10.1093/carcin/bgs134.
- Staal, G. E. J. *et al.* (1975) 'Normalisation of red blood cell pyruvate kinase in pyruvate kinase deficiency by riboflavin treatment', *Clinica Chimica Acta*. Elsevier, 60(3), pp. 323–327. doi: 10.1016/0009-8981(75)90074-1.
- Stanley, C. A. (2009) 'Regulation of glutamate metabolism and insulin secretion by glutamate dehydrogenase in hypoglycemic children', *American Journal of Clinical Nutrition*, 90, pp. 862. doi: 10.3945/ajcn.2009.27462AA.This.
- Storey, K. B., Fields, J. H. A. and Hochachka, P. W. (1978) 'Purification and properties of glutamate dehydrogenase from the mantle muscle of the squid, *Loligo pealeii*. Role of the enzyme in energy production from amino acids', *Journal of Experimental Zoology*, 205(1), pp. 111–118. doi: 10.1002/jez.1402050113.
- Sugita, T. *et al.* (2001) 'Response of enzyme activities and metabolic intermediate concentrations to a long burst of exercise and following resting in muscle and the hepatopancreas of carp', *Fisheries Science*. Blackwell Science Pty, 67(5), pp. 904–911. doi: 10.1046/j.1444-2906.2001.00340.x.
- Syed, S. E. H., Engel, P. C. and Parker, D. M. (1991) 'Functional studies of a glutamate dehydrogenase with known three-dimensional structure: steady-state kinetics of the forward and reverse reactions catalysed by the NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosum*', *BBA - General Subjects*. Elsevier, 1115(2), pp. 123–130. doi: 10.1016/0304-4165(91)90020-H.
- T.**
- Tacon, A. G. J., Hasan, M. R. and Metian, M. (2011) Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: Trends and prospects, *FAO Fisheries and Aquaculture*. doi: 10.4172/2155-9546.1000234.
- Tan, M. *et al.* (2014) 'Lysine Glutarylation Is a Protein Posttranslational Modification Regulated by SIRT5', *Cell Metabolism*, 19, pp. 605–617. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.014.
- Teerijoki, H. *et al.* (2000) 'Cloning and characterization of glucose transporter in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).', *Biochimica et biophysica acta*, 1494(3), pp. 290–294.
- Teerijoki, H. *et al.* (2001) 'Rainbow trout glucose transporter (OnmyGLUT1): functional assessment in *Xenopus laevis* oocytes and expression in fish embryos.', *The Journal of experimental biology*, 204(Pt 15), pp. 2667–2673.
- Tian, J. *et al.* (2015) 'Effects of postprandial starvation on mRNA expression of endocrine-, amino acid and peptide transporter-, and metabolic enzyme-related genes in zebrafish (*Danio rerio*)', *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(3), pp. 773–787. doi: 10.1007/s10695-015-0045-x.
- Tomita, A. *et al.* (2000) 'c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 19(3), pp. 444–451. doi: 10.1038/sj.onc.1203329.
- Tomkins, M., Yielding, K. L. and Curran, J. F. (1962) 'The influence of diethylstilbestrol and adenosine diphosphate on pyridine nucleotide coenzyme binding by glutamic dehydrogenase.', *The Journal of biological chemistry*, 237(5), pp. 1704–1708.
- Tranulis, M. A. *et al.* (1991) 'Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of starvation and temperature variations', *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, 99(3), pp. 687–691. doi: 10.1016/0305-0491(91)90355-H.
- V.**
- Vallet, V. S. *et al.* (1997) 'Glucose-dependent liver gene expression in upstream stimulatory factor 2 -/- Mice', *Journal of Biological Chemistry*, 272(35), pp. 21944–21949. doi: 10.1074/jbc.272.35.21944.

Vallet, V. S. *et al.* (1998) 'Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose', *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), pp. 20175–20179. doi: 10.1074/jbc.273.32.20175.

Viegas, I. *et al.* (2015) 'Contribution of dietary starch to hepatic and systemic carbohydrate fluxes in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.)', *The British journal of nutrition*, 113, pp. 1345–54. doi: 10.1017/S0007114515000574.

Villen, J. *et al.* (2007) 'Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), pp. 1488–1493. doi: 10.1073/pnas.0609836104.

Viollet, B. *et al.* (1996) 'Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms', *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), pp. 1405–1415. doi: 10.1074/jbc.271.3.1405.

W.

Walton, M. J. and Cowey, C. B. (1982) 'Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish', *Biochem. Physiol*, 73(1), pp. 59–79.

Wang, D. M. and Lipsick, J. S. (2002) 'Mutational analysis of the transcriptional activation domains of v-Myb', *Oncogene*, 21(10), pp. 1611–1615. doi: 10.1038/sj.onc.1205236.

Wang, J. *et al.* (2016) 'Effects of different dietary carbohydrate levels on growth, feed utilization and body composition of juvenile grouper *Epinephelus akaara*', *Aquaculture*, 459, pp. 143–147. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.03.034.

Wang, X. G. and Engel, P. C. (1995) 'Positive Cooperativity with Hill Coefficients of Up to 6 in the Glutamate Concentration Dependence of Steady-State Reaction Rates Measured with Clostridial Glutamate Dehydrogenase and the Mutant A163G at High pH', *Biochemistry*. American Chemical Society, 34(36), pp. 11417–11422. doi: 10.1021/bi00036a014.

Wang, Y. *et al.* (2015) 'Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis', *Nature Publishing Group*, 16. doi: 10.1038/nrm4074.

Wasserman, W. W. and Sandelin, A. (2004) 'Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements', *Nature Reviews Genetics*, 5(4), pp. 276–287. doi: 10.1038/nrg1315.

Westin, E. H. *et al.* (1982) 'Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(7), pp. 2194–8.

Wilczek, C. *et al.* (2009) 'Myb-induced Chromatin Remodeling at a Dual Enhancer/Promoter Element Involves Non-coding RNA Transcription and Is Disrupted by Oncogenic Mutations of v- myb', *Journal of Biological Chemistry*, 284(51), pp. 35314–35324. doi: 10.1074/jbc.M109.066175.

Wilkie, M. P. (2002) 'Ammonia Excretion and Urea Handling by Fish Gills: Present Understanding and Future Research Challenges', *Journal of Experimental Zoology*, p. 293:284–301. doi: 10.1002/jez.10123.

Wilson, R. P. (1994) 'Utilization of dietary carbohydrate by fish', *Aquaculture*, pp. 67–80. doi: 10.1016/0044-8486(94)90363-8.

Wong, R. H. F. *et al.* (2009) 'A Role of DNA-PK for the Metabolic Gene Regulation in Response to Insulin', *Cell*, 136(6), pp. 1056–1072. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.040.

Wong, R. H. F. and Hei, S. S. (2009) 'DNA-PK: Relaying the insulin signal to USF in lipogenesis', *Cell Cycle*, 8(13), pp. 1977–1978. doi: 10.4161/cc.8.13.8941.

Wood, C. M., Pärt, P. and Wright, P. A. (1995) 'Summary Ammonia and urea metabolism in relation to gill function and acid-base balance in a marine elasmobranch, The spiny dogfish (*Squalus acanthias*)', *The Journal of Experimental Biology*, 198, pp. 1545–1558.

Wright, P. A. and Wood, C. M. (2009) 'A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins', *Journal of Experimental Biology*, 212(15), pp. 2303–2312. doi: 10.1242/jeb.023085.

Y.

Yasumoto, K. and Shibahara, S. (1997) 'Molecular cloning of cDNA encoding a human TFEC isoform, a newly identified transcriptional regulator.' *Biochimica et biophysica acta*, 1353(1), pp. 23–31.

Yielding, K. L. and Tomkins, G. M. (1960) 'Structural Alterations in Crystalline Glutamic Dehydrogenase Induced by Steroid Hormones', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, pp. 1483–1488. doi: 10.2307/70884.

Z.

Zaganas, I. *et al.* (2013) 'The effect of pH and ADP on ammonia affinity for human glutamate dehydrogenases', in *Metabolic Brain Disease*, pp. 127–131. doi: 10.1007/s11011-013-9382-6.

Zaganas, I. and Plaitakis, A. (2002) 'Single amino acid substitution (G456A) in the vicinity of the GTP binding domain of human housekeeping glutamate dehydrogenase markedly attenuates GTP inhibition and abolishes the cooperative behavior of the enzyme', *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), pp. 26422–26428. doi: 10.1074/jbc.M200022200.

Zervos, A. S., Gyuris, J. and Brent, R. (1993) 'Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites', *Cell*, 72(2), pp. 223–232. doi: 10.1016/0092-8674(93)90662-A.

Zhang, Z. *et al.* (2003) 'Isolation, characterization and expression analysis of a hypoxia-responsive glucose transporter gene from the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*', *European Journal of Biochemistry*, 270(14), pp. 3010–3017. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03678.x.

Zhao, S. *et al.* (2010) 'Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation', *Science*, 327(5968).

Zhou, Y. and Ness, S. A. (2011) 'Myb proteins: angels and demons in normal and transformed cells.', *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. NIH Public Access, 16, pp. 1109–31.

Zor, T. *et al.* (2004) 'Solution Structure of the KIX Domain of CBP Bound to the Transactivation Domain of c-Myb', *Journal of Molecular Biology*, 337(3), pp. 521–534. doi: 10.1016/j.jmb.2004.01.038.

Zorbas, M. *et al.* (1999) 'c-Myb is critical for murine colon development', *Oncogene*, 18(42), pp. 5821–5830. doi: 10.1038/sj.onc.1202971.

8. ANEXOS

Artículos remitidos

1.- Role of upstream stimulatory factor 2 in glutamate dehydrogenase gene transcription

Carlos Gaspar¹, María C. Salgado², Isabel V. Baanante¹ and Isidoro Metón^{1,*}

¹Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27, 08028 Barcelona, Spain

²Servei de Bioquímica Clínica, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona), Spain

*Corresponding author: Isidoro Metón, Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024521; Fax: +34 934024520; E-mail: imeton@ub.edu

2.- Metabolic effects of knockdown of glutamate dehydrogenase expression in the liver of

Sparus aurata

Carlos Gaspar^a, Jonás I. Silva-Marrero^a, Anna Fàbregas^b, Montserrat Miñarro^b, Josep R. Ticó^b, Isabel V. Baanante^a and Isidoro Metón^{a,*}

^aSecció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27, 08028 Barcelona, Spain

^bDepartament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, i Físicoquímica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27, 08028 Barcelona, Spain

*Corresponding author: Isidoro Metón, Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024521; Fax: +34 934024520; E-mail: imeton@ub.edu

Role of upstream stimulatory factor 2 in glutamate dehydrogenase gene transcription

Carlos Gaspar¹, María C. Salgado², Isabel V. Baanante¹ and Isidoro Metón^{1,*}

¹Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27, 08028 Barcelona, Spain

²Servei de Bioquímica Clínica, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona), Spain

*Corresponding author: Isidoro Metón, Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024521; Fax: +34 934024520; E-mail: imeton@ub.edu

Short title: Usf2 transactivates *glud* gene promoter

Keywords: Upstream stimulatory factor 2, glutamate dehydrogenase, promoter transactivation, starvation, liver, *Sparus aurata*

Word count: 4977 (text: Introduction to Acknowledgements, excluding References and Figure legends).

Abstract

Glutamate dehydrogenase (Gdh) plays a central role in ammonia detoxification by catalysing reversible oxidative deamination of L-glutamate into α -ketoglutarate using NAD⁺ or NADP⁺ as cofactor. To gain insight into transcriptional regulation of *glud*, the gene that codes for Gdh, we isolated and characterised the 5' flanking region of *glud* from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In addition, tissue distribution and the effect of starvation and short- and long-term refeeding on Gdh mRNA levels in the liver of *S. aurata* were also addressed. 5'-deletion analysis of *glud* promoter in transiently transfected HepG2 cells, electrophoretic mobility shift assays and site-directed mutagenesis allowed us to identify upstream stimulatory factor 2 (Usf2) as a novel factor involved in the transcriptional regulation of *glud*. Analysis of tissue distribution of Gdh and Usf2 mRNA levels by reverse transcriptase-coupled quantitative real-time PCR (RT-qPCR) showed that Gdh is mainly expressed in the liver of *S. aurata*, while Usf2 displayed ubiquitous distribution. RT-qPCR assays revealed that long-term starvation down-regulated the hepatic expression of Gdh and Usf2 to similar levels, while refeeding resulted in a slow but gradual restoration of both Gdh and Usf2 mRNA abundance. In addition to demonstrate that Usf2 transactivates *S. aurata glud* by binding to an E-box located in the proximal region of *glud* promoter, our findings provide evidence for a new regulatory mechanism involving Usf2 as a key factor in the transcriptional regulation of *glud* by starvation and refeeding in the fish liver.

Introduction

Glutamate dehydrogenase (Gdh) catalyses reversible oxidative deamination of glutamate to form α -ketoglutarate and ammonia while reducing NAD(P)^+ to NAD(P)H . Encoded by the *glud* gene, Gdh plays a major role in ammonia detoxification in the liver, acid excretion by providing urinary ammonia in the kidneys, amplification of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells, cycling of the neurotransmitter glutamate between neurons and astrocytes, and glutathione synthesis, among others (Newsholme *et al.* 2003; Karaca *et al.* 2011; Göhring & Mulder 2012; Treberg *et al.* 2014; Bunik *et al.* 2016). Located in the mitochondrial matrix, Gdh activity is subjected to a complex regulation. Gdh is strongly inhibited by GTP and activated by ADP. GTP binding is antagonised by phosphate and ADP, but is synergistic with NADH bound to a second, non-catalytic site. Gdh is also activated by leucine and other monocarboxylic acids, while it is inhibited by palmitoyl-CoA and diethylstilbestrol (Li *et al.* 2014; Plaitakis *et al.* 2017). Reversible cystein-specific ADP-ribosylation inactivates Gdh (Haigis *et al.* 2006). Gdh activity comes, at least in part, from association to a multienzyme complex in the mitochondrion, as it was deduced by the fact that short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (SCHAD) inhibits Gdh via protein-protein interaction in the pancreas, where SCHAD is expressed at high levels (Li *et al.* 2010).

Glutamate metabolism in fish differs from that in mammals. Glutamate is primarily deaminated in the fish liver with ammonia production, while in mammals most glutamate is transaminated to aspartate (Peres & Oliva-Teles 2006). The fact that Gdh plays a major role in amino acid oxidation in the liver, led to consider Gdh a marker for protein utilisation and ammonia excretion in fish (Liu *et al.* 2012). Gdh is mainly expressed in the piscine liver, and high-protein diets usually stimulate growth and hepatic Gdh activity in fish (Bibiano Melo *et al.* 2006; Borges *et al.* 2013; Viegas *et al.* 2015; Coutinho *et al.* 2016). Dietary protein increases plasma free amino acids, which in turn enhances Gdh deamination and leads to higher rates of ammonia excretion. Dietary supplementation of glutamate down-regulates Gdh mRNA levels and decreases reductive Gdh activity in the liver of *Sparus aurata* (Gómez-Requeni *et al.* 2003; Caballero-Solares *et al.* 2015) and reduces Gdh activity in *Pagellus bogaraveo* (Figueiredo-Silva *et al.* 2010), while it increases in *Oncorhynchus mykiss* (Moyano *et al.* 1991).

Little is known about transcriptional regulation of Gdh expression in vertebrates. *In silico* analysis allowed detection of potential binding sites for a number of transcription factors, such as Sp1, AP-1, and AP-2 in humans, and Sp1 and Zif268 in rats (Das *et al.* 1993; Michaelidis *et al.* 1993). The functionality of these sites remains unclear. A glucocorticoid-responsive region was located in the gene promoter of the mouse astrocyte-derived cell line, C8S (Hardin-Pouzet *et al.* 1996). Deletion of the gene coding for the transcriptional coactivator p300 in the human colon carcinoma cell line HCT116 down-regulates Gdh expression (Bundy *et al.* 2006). Despite the important role exerted by Gdh in various tissues, to our knowledge there are no reports that have addressed isolation and molecular characterisation of *glud* gene promoter from fish.

With the aim of increasing current knowledge about the transcriptional regulation of *glud*, in the present study we characterised for the first time a piscine *glud* promoter and addressed the role of upstream stimulatory factor 2 (Usf2) on *glud* transcription in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In addition to report

for the first time transactivation of *glud* gene promoter by Usf2, we explored changes in Gdh and Usf2 expression associated to starvation and refeeding in the liver of *S. aurata*.

Materials and methods

Experimental animals

Gilthead seabream (*S. aurata*) juveniles were obtained from Tinamenor (Cantabria, Spain). Fish were maintained at 20 °C in 260-L aquaria supplied with running seawater as previously described (Fernández *et al.* 2007). The photoperiod was a 12 h light, 12 h dark cycle. The effect of starvation and refeeding on Gdh and Usf2 mRNA levels was analysed in the liver of 18-day fed fish, 19-day starved fish and fish refed for 6 hours, 24 hours, 5 days and 14 days. The diet supplied to the animals contained 46% protein, 9.3% carbohydrates, 22% lipids, 10.6% ash, 12.1% moisture and 21.1 kJ/g gross energy. Fish were fed 25 g/kg body weight (BW) once a day (10 a.m.) except during starvation. To prevent stress, fish were anaesthetised with MS-222 (1:12,500) before handling. Twenty-four hours after the last meal, fish were sacrificed by cervical section and tissue samples were immediately dissected out, frozen in liquid N₂ and kept at -80 °C until use. The University of Barcelona's Animal Welfare Committee approved the experimental procedures (proceeding #461/16) in compliance with local and EU legislation.

Characterization of the transcription start site

The 5' end of *S. aurata* Gdh mRNA was determined using the First Choice RLM-RACE Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RLM-RACE allows amplification of cDNA only from full-length, capped mRNA (Schaefer 1995). Briefly, 10 µg of total RNA from the liver of *S. aurata* were treated with calf intestine alkaline phosphatase at 37 °C for 1 h to remove free 5'-phosphates from degraded RNA molecules and contaminating genomic DNA. After phenol-chloroform extraction and isopropanol precipitation, RNA was resuspended and treated with tobacco acid pyrophosphatase with at 37 °C for 1 h to remove the cap structure from full-length mRNA, leaving a 5'-monophosphate that was required for further ligation of the 5' RACE adapter oligonucleotide from the kit. Following a random-primed reverse transcription reaction, a nested PCR was performed to amplify the 5' end of *S. aurata* Gdh mRNA using gene-specific primers CG1307 and CG1308 for the outer and inner PCR, respectively (Table 1). Both primers were designed from the *S. aurata* partial cDNA sequence with GenBank accession no. JX073708. The single 942-bp band generated was purified and ligated into pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA). Identical nucleotide sequence corresponding to the 5' end of Gdh cDNA was obtained by sequence analysis of three independent clones.

Isolation of the 5'-flanking region of *glud* gene from *S. aurata* by chromosome walking

The 5'-flanking region of *S. aurata glud* was isolated using the Universal GenomeWalker Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) and gene-specific primers CG1315 and CG1316 (Table 1), which were designed from the nucleotide sequence of the 5' end of *S. aurata* Gdh cDNA. Four libraries obtained by blunt-end digestion

of *S. aurata* genomic DNA with *Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II, and *Stu*I, respectively, were ligated to the GenomeWalker adaptor from the kit as described elsewhere (Metón *et al.* 2006). A primary PCR round was performed on each library with the gene-specific primer CG1316 and the adaptor primer AP-1 provided in the kit. Nested PCR was performed on the primary PCR product using the gene-specific primer CG1315 and the adaptor primer AP-2 from the kit. The longer amplification product, a single ~2.1-kb band obtained from the *Pvu*II library, was isolated and ligated into pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) to generate pGEM-GDH2057. Two independent clones were fully sequenced on both strands, following the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Construction of reporter gene plasmids

To generate pGDH1286, the *S. aurata glud* promoter sequence located between positions -1286 and +70 relative to the transcription start site was obtained by digestion of pGEM-GDH2057 with *Not*I, followed by fill-in and *Nhe*I digestion. The resulting product was subcloned into the *Sma*I/*Nhe*I site of the promoterless luciferase reporter plasmid pGL3-Basic (Promega, Madison, WI, USA). To obtain pGDH982, the promoter fragment obtained by digestion of pGDH1286 with *Pst*I followed by chew back, fill-in and *Hind*III digestion, was subcloned into pGL3-Basic, previously digested with *Mlu*I, filled-in and *Hind*III digested. The pGDH+19, pGDH85 and pGDH128 constructs were generated by PCR amplification using pGDH1286 as template and primer pairs CG1344 (with a 5'-anchor sequence containing a *Sma*I site; Table 1)/RVprimer3 (Promega, Madison, WI, USA), CG1345 (with a 5'-anchor sequence containing a *Bsr*BI site; Table 1)/RVprimer3, and CG1342 (with a 5'-anchor sequence containing a *Pvu*II site; Table 1)/RVprimer3, respectively. The PCR products were digested with *Sma*I, *Bsr*BI and *Pvu*II, respectively, isolated and subcloned into pGL3-Basic, previously digested with *Mlu*I, filled-in and *Hind*III digested. pGDH413 was produced by *Nde*I/*Mlu*I digestion, filling-in and self-ligation of pGDH1286. pGDH982Δ-44/+70 was obtained by *Cfr*42I digestion of pGDH982, isolation of the major product and self-ligation. pGDH982mutU_sf2 was obtained by PCR amplification using pGDH1286 as template and primer pair CG1552 (harbouring a mutated E-box and a 5'-anchor sequence with a *Cfr*42I site; Table 1)/GLprimer2 (Promega, Madison, WI, USA), and subcloning of the resulting amplicon into pGDH982, previous digestion of both amplicon and plasmid with *Cfr*42I. All constructs were verified by sequencing using ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Cell transfection and luciferase assay

The human hepatoma-derived cell line HepG2 (ATCC HB 8065) was cultured in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 110 mg/l sodium pyruvate, 10% foetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were grown at 37 °C in 5 % CO₂. HepG2 cells at 45–50 % confluence were transiently transfected in six-well plates using the calcium phosphate coprecipitation method. Cells were transfected with 4 µg of the corresponding reporter construct and with or without 400 ng of the expression

vector encoding Usf2. To correct for variations in transfection efficiency, 500 ng of CMV- β plasmid (*lacZ*) were included in each transfection. To ensure equal DNA amounts, empty plasmids were added in each transfection. Transfected cells were harvested 16 h later, washed in PBS and incubated for 15 min in 300 μ l of Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Madison, WI, USA). Cell debris was removed by centrifugation at 10,000 *g* for 15 sec, and luciferase activity in the supernatant was assayed in a TD-20/20 Luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA) after the addition of Luciferase Assay Reagent (Promega, Madison, WI, USA). The activity of β -galactosidase activity of the clear lysate was assayed as described (Metón *et al.* 2006). The Usf2 expression plasmid was kindly provided by Dr. B. Viollet (Viollet *et al.* 1996).

Electrophoretic mobility shift assay

Hybridisation of oligonucleotide pairs CG1563/CG1564, CG1565/CG1566 and CG1561/CG1562 (Table 1), allowed us to obtain double-stranded oligonucleotides named GDH-22/+9, GDH-22/+9mutUSF (with a mutated E-box element), and USF2-cons (with a consensus Usf2 binding box), respectively, for gel-shift experiments. Two hundred pmol of double-stranded oligonucleotides were 3'-end labelled with digoxigenin-11-ddUTP in a 20- μ l reaction for 30 min at 37 °C using terminal transferase (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland). The reaction was stopped by the addition of 2 μ l of 0.2 m EDTA. Binding reactions were carried out in a total volume of 20 μ l containing 100 mM HEPES, pH 7.6, 5 mM EDTA, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM dithiothreitol, 1% Tween 20, 150 mM KCl, 1 μ g of non-specific competitor poly [d(I-C)], nuclear extracts of HepG2 cells overexpressing Usf2, and labelled probe. DNA-protein complexes were electrophoresed at 4 °C on a 5 % polyacrylamide gel using 0.5 x Tris-borate-EDTA buffer. Thereafter, DNA was transferred by contact blotting (2 h at room temperature) to Nytran membranes (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA) and cross-linked by UV irradiation for 3 min. Labelled probes were immunodetected with antidigoxigenin conjugated to alkaline phosphatase using CDP-Star (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland) as chemiluminescent substrate. Digital imaging of chemiluminescent membranes was performed using ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). For competition experiments, HepG2 extracts were preincubated for 30 min with 200- and 1000-fold molar excess of unlabelled double-stranded USF2-cons.

Nuclear extracts

Nuclear extracts were prepared from HepG2 cells as described (Andrews & Faller 1991) with minor modifications. Cells were grown to about 80 % confluency, washed, and scraped into 1.5 ml of cold PBS. The following steps were all performed at 4 °C. Cells were pelleted by centrifugation for 10 sec at 1000 *g* and resuspended in 0.4 ml of buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Following 10 min of incubation, cells were vortexed for 10 sec and centrifuged for 10 sec. The pellet was resuspended in 20 μ l of ice-cold buffer C (20 mM HEPES, pH 7.9, 25 % glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and incubated 20 min for high-salt extraction. Cell debris was removed by centrifugation for 2 min. The supernatant fraction was aliquoted and stored at -80 °C until use.

Quantitative real-time RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from powdered liver samples using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Single-stranded complementary DNA templates for PCR amplification were synthesised from 1 µg of total RNA by incubation with reverse transcriptase M-MLV RT (Promega, Madison, WI, USA) at 37°C for 1 h. The mRNA levels of Gdh and Usf2 were determined in a Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using 0.4 µM of each primer (CG1543/CG1544 and CG1557/CG1558 for Gdh and Usf2, respectively; Table 1), 10 µl of SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and 1.6 µl of 1:10 diluted cDNA in a final volume of 20 µl. The temperature cycle protocol for amplification was 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles with 95 °C for 15 s and 62 °C for 1 min. A dissociation curve was run after each experiment to ensure that only one product was amplified. The amount of mRNA for the gene of interest in each sample was normalised with ribosomal subunit 18s, beta-actin and elongation factor 1-alpha (EEF1A1) as endogenous controls using primer pairs JDRT18S/JDRT18AS, QBACTINF/QBACTINR and AS-EF1Fw/AS-EF1Rv, respectively (Table 1). Variations in gene expression were calculated by the standard $\Delta\Delta C_T$ method (Pfaffl 2001).

Statistics

Data were analysed by one-way ANOVA using the SPSS software Version 22 (IBM, Armonk, NY, USA). The Bonferroni post hoc test was used to determine significant differences among nutritional conditions ($p < 0.05$).

Results

Cloning of the 5' flanking region of *S. aurata* *glud* gene

A 5' RLM RACE using total RNA from the liver of *S. aurata* was performed to determine the nucleotide sequence of the 5' end of *S. aurata* Gdh mRNA. Sequence analysis of the 5' end of Gdh mRNA allowed designing of gene-specific primers and isolation of a 2057 bp fragment upstream from the translation start codon of *S. aurata glud* gene by chromosome walking on genomic DNA. In addition, the 5' RLM RACE approach was used to determine the putative transcription initiation site of Gdh mRNA (Schaefer 1995). A single fragment was obtained and cloned into pGEM-T Easy. Analysis of two independent clones indicated that *S. aurata* Gdh mRNA initiates 140 nucleotides upstream from the translation start codon. Sequence analysis of the 1286-bp 5'-flanking region with JASPAR (Sandelin *et al.* 2004) revealed the presence of a TATA box at positions -32 to -18 relative to the transcription start site, and several putative transcription factor binding sites. Potential transcription factor sites included binding boxes for Usf2, Cebp and Hnf1, among others (Fig. 1). The nucleotide sequence of *S. aurata* Gdh mRNA and *glud* gene promoter were submitted to the GenBank database under the accession numbers MF459045 and MF459046, respectively.

Functionality of *S. aurata glud* promoter

To assess whether the isolated 5'-flanking region of *S. aurata glud* gene encompasses a functional promoter, nucleotide positions -1286 to +70 relative to the transcriptional start were subcloned into the promoterless pGL3-Basic plasmid upstream from the luciferase reporter gene. HepG2 cells were transiently cotransfected with the resulting construct (pGDH1286; -1286 to +70) together with a *lacZ*-containing plasmid, which was used as internal control for transfection efficiency. Consistent with the presence of a functional promoter in the region comprised within 1286 nucleotides upstream from the transcription start site of *S. aurata glud*, transfection with pGDH1286 resulted in a 45-fold increase of luciferase activity relative to pGL3-Basic (Fig. 2). To identify functional regions involved in modulation of basal Gdh expression in *S. aurata*, a sequential 5'-deletion analysis of the isolated promoter was performed. To this end, HepG2 cells were transfected with pGL3-Basic constructs harbouring deletion fragments of *glud* promoter (5' ends ranging from -1286 to +19 and 3' ends at -70) fused to the luciferase reporter gene. The longer 5' constructs (pGDH1286 and pGDH982; -982 to +70) yielded similar results, approximately a 45-fold increase in luciferase activity relative to the empty vector. The reporter constructs pGDH413 (-413 to +70), pGDH128 (-128 to +70) and pGDH85 (-85 to +70) exhibited a 25- to 30-fold increase of promoter activity compared to pGL3-Basic. A significant drop of luciferase activity was observed when using the smallest construct (pGDH+19; +19 to +70) or pGDH982Δ-44/+70, which is a deleted construct that encompasses promoter sequences located at position -982 to +70 relative to the transcription start site, but lacking the region comprised between positions -44 and +70 (Fig. 2). These results indicate that the core promoter of *S. aurata glud* localizes within 85 bp upstream from the transcriptional start and suggest the presence of *cis*-acting elements in this region.

Transactivation of *S. aurata glud* promoter by Usf2

Analysis of *glud* promoter with JASPAR (Sandelin *et al.* 2004) revealed the presence of an E-box that could function as a putative binding site for Usf2 in the proximal promoter region of *S. aurata glud* (Fig. 1). Usf proteins regulate the transcription of essential gene networks. The fact that USF2 null-mutant mice are small and exhibit decreased fertility and reduced lifespan, while USF1 null mice present a rather normal phenotype, highlights Usf2 as the more important Usf variant (Siritto *et al.* 1998; Horbach *et al.* 2014). To study the role of Usf2 in Gdh expression we performed transfection experiments on HepG2 cells in the presence or absence of an expression plasmid encoding Usf2. Cotransfection with the Usf2 expression plasmid together with pGDH85 or longer 5' constructs increased about 4-fold *glud* promoter activity compared to the basal activity of the corresponding promoter constructs. No Usf2-dependent enhancement of *glud* transcription was observed when using the shortest construct (pGDH+19). Altogether, these results suggest that a functional binding site recognised by Usf2 may be located within 85 pb upstream from the transcription start site. Consistent with this hypothesis, no transactivation of *glud* was observed as a result of cotransfection of HepG2 cells with the Usf2 expression plasmid together with the pGDH982Δ-44/+70 reporter construct, which lacks the region between positions +70 and -44 (Fig. 3).

Usf2 binds to *glud* promoter

The shorter reporter construct that exhibited Usf2-mediated transactivation (pGDH85) contains an E-box at positions -10 to -5 relative to the transcription start site. Bearing in mind that Usf2 regulates the transcription of a wide number of genes by binding to E-boxes (Corre & Galibert 2005), electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed with nuclear extracts obtained from HepG2 cells overexpressing Usf2. One major shifted band with the same mobility was observed when using probes GDH-22/+9 (with a putative E-box at positions -10 to -5) and USF2-cons (containing a consensus Usf2 binding site). The shifted DNA-protein complex disappeared by competition with 200- to 1000-fold molar excess of unlabelled USF2-cons. These results confirm binding of Usf2 to a response element at positions -22 to +9 of *S. aurata glud*. As shown in Fig. 4A, bandshift experiments performed using nuclear extracts of HepG2 cells overexpressing Usf2 and a labelled probe harbouring positions -22 to +9 of *glud* but with a mutated E-box element (GDH-22/+9mutUSF) completely prevented the formation of DNA-protein complexes.

Mutating the E-box abolishes transactivation by Usf2

To analyse the effect of mutating the E-box located at positions -10 to -5 on the transactivating action of Usf2, we generated a reporter construct containing the same mutations introduced in the double-stranded oligonucleotide GDH-22/+9mutUSF used for bandshift assays. Transient cotransfection of HepG2 cells with the resulting construct (pGDH982mutUSF2; -982 to +70 with a mutated E-box) and the Usf2 expression vector showed that Usf2 could not enhance the transcription of the construct harbouring the mutated E-box (Fig. 4B). Therefore, the E-box located at positions -10 to -5 relative to the major transcription start site of the *S. aurata glud* promoter is responsible for transactivation by Usf2.

Tissue distribution of Gdh and Usf2 expression in *S. aurata*

With the aim of studying tissue specificity of Gdh and Usf2 expression in *S. aurata*, reverse transcriptase-coupled quantitative real-time PCR assays (RT-qPCR) were performed in tissue samples of fed *S. aurata*. The highest mRNA levels of Gdh were found in the liver, followed by the intestine, heart and kidney. Other tissues analysed presented barely detectable levels of Gdh expression. A different tissue expression profile was observed for Usf2. Usf2 was ubiquitously expressed, albeit the higher Usf2 mRNA abundance was exhibited by the brain and spleen, followed by the heart, gill, kidney and liver.

Effect of starvation and refeeding on the hepatic expression of Gdh and Usf2

Having concluded that Usf2 can bind and transactivate *glud* promoter in the liver, we addressed the role that Usf2 may exert in the nutritional regulation of the hepatic transcription of *glud* in *S. aurata*. To this end, the mRNA levels of Gdh and Usf2 were determined by RT-qPCR in liver samples of 18-day fed fish, 19-day starved fish and fish refed up to 14 days. Changes in the nutritional status of fish affected similarly Gdh and Usf2 expression. Starvation significantly decreased 1.7-fold the mRNA levels of both Gdh and

Usf2. Remarkably, a trend to present lower expression levels of Gdh and Usf2 than starved fish was observed 6 hours after refeeding. Thereafter, Gdh and Usf2 gradually recovered their mRNA levels until reaching total restoration after 14 days of refeeding.

Discussion

In the liver, Gdh is essential for ammonia detoxification, nitrogen metabolism and urea synthesis (Karaca *et al.* 2011; Treberg *et al.* 2014). However, knowledge of the transcription factors involved in the regulation of *glud* gene expression is scarce. To study the transcriptional regulation of *glud*, we addressed cloning and characterisation of *S. aurata glud* promoter by chromosome walking. Functionality of *S. aurata glud* promoter was confirmed by transient transfection of HepG2 cells with fusion constructs of sequential 5'-deletions of the isolated genomic fragment to the luciferase gene. We found that the core functional promoter of *S. aurata glud* is comprised within 85 bp upstream from the transcription start site. The presence of a putative Usf2 binding box in the proximal region of *glud* gene promoter prompted us to study involvement of Usf2 in the transcriptional regulation of *glud*.

Usf proteins belong to the basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLHzip) transcription factor family and are encoded by two different genes: *usf1* and *usf2*. Usf proteins regulate the transcription of a wide number of genes involved in stress and immune responses, cell cycle and proliferation, and carbohydrate and lipid metabolism, among other functions, by binding as homodimers and heterodimers to the E-box binding motif CANNTG (being NN nucleotides in most cases either GC or CG), non-canonical E-boxes and pyridine-rich initiator sites (Viollet *et al.* 1996; Corre & Galibert 2005; Pawlus *et al.* 2012). Transient transfection studies in HepG2 cells and EMSA assays allowed us to demonstrate that Usf2 transactivates the promoter activity of *S. aurata glud* through binding to the E-box located at positions -10 to -5 upstream from the transcriptional start. Transactivation of *glud* by Usf2 was confirmed by introducing mutations in the E-box that abolished binding of Usf2 and prevented Usf2-dependent enhancement of *glud* transcription.

Optimal growth of teleostean fish requires higher levels of dietary protein than other vertebrates. Fish metabolism, and more remarkably that of carnivorous fish, enables efficient use of amino acids for growth and to obtain energy (Li *et al.* 2009; Kaushik & Seiliez 2010; Liu *et al.* 2012). The fish liver is the main site for amino acid catabolism, where Gdh exerts a major role in amino acid transdeamination by catalysing oxidative deamination of glutamate and giving rise to the end product of protein catabolism, ammonia (Lushchak *et al.* 2008). As for other fish species (Liu *et al.* 2012) and similarly as for mammals (Plaitakis *et al.* 2017), we found that Gdh is mainly expressed in the liver of *S. aurata*, while high mRNA levels were also observed in the kidney, heart and intestine. In contrast to Gdh, Usf2 displayed ubiquitous expression in *S. aurata* tissues, albeit higher mRNA levels were found in the brain, spleen, heart, gill, kidney and liver. These results are consistent with the pattern of tissue distribution of Usf2 in other vertebrates (Siritto *et al.* 1994; Fujimi & Aruga 2008). Our findings suggest that in addition to Usf2-dependent transactivation of *glud* promoter, other yet unknown transcription factors may contribute to upregulation of Gdh mRNA levels in the piscine liver. Posttranslational modifications as phosphorylation or interaction with other

transcription factors and cofactors may also explain tissue-specific differences in Usf2 action (Spohrer *et al.* 2016).

Since Gdh expression can be considered a significant marker for protein utilisation and ammonia excretion in fish (Liu *et al.* 2012), we also addressed the effect of nutritional status on hepatic mRNA levels of Gdh, and the role that Usf2 may have on *glud* transcription under starvation and during the starved-to-fed transition in the liver of *S. aurata*. Long-term starvation similarly affected the hepatic expression of Usf2 and Gdh, which significantly decreased to about 60 % of the values observed in fed fish. Downregulation of Gdh expression in starved *S. aurata* may be related with a mechanism preventing insulin secretion in β -cells. In favour of this hypothesis, overexpression of Gdh in mice increases insulin secretion (Carobbio *et al.* 2004), whereas Gdh inhibition in pancreatic β -cells decrease impairs insulin secretion (Carobbio *et al.* 2009). Furthermore, activating mutations in Gdh causes hyperinsulinemia and hyperammonemia in humans (Li *et al.* 2014; Barrosse-Antle *et al.* 2017). However, the effect of nutritional status on Gdh expression seems species-specific in fish. In contrast to *S. aurata*, starvation did not affect Gdh activity in *Salmo gairdneri* (Tranulis *et al.* 1991), while it increased Gdh activity in the liver of *Oncorhynchus mykiss*, *Protopterus dolloi* and *Dentex dentex*, and Gdh mRNA levels in *Danio rerio* (Sánchez-Muros *et al.* 1998; Frick *et al.* 2008; Pérez-Jiménez *et al.* 2012; Tian *et al.* 2015). We cannot discard that in addition to species-specificity, differences in the effect of starvation on the expression of Gdh among experiments may result also from diet composition, ration size and feeding regime. In this regard, it is well known that dietary protein greatly influences the hepatic activity of Gdh in fish (Liu *et al.* 2012; Borges *et al.* 2013; Caballero-Solares *et al.* 2015; Viegas *et al.* 2015; Coutinho *et al.* 2016). Indeed, it was reported that starvation decreased or unaffected Gdh activity in the liver of starved *Dicentrarchus labrax* depending on dietary protein levels (Pérez-Jiménez *et al.* 2007). As for Gdh, starvation decreased hepatic mRNA levels of Usf2 in the liver of *S. aurata*. In this regard, it was previously reported that high glucose levels upregulate Usf2 expression in human-derived HK-2 cells and primary rat mesangial cells (Shi *et al.* 2008; Visavadiya *et al.* 2011; Wang 2015). Therefore, low levels of glycemia associated to long-term starvation may be critical to downregulate Usf2 expression, which in turn may lead to decreased Gdh mRNA levels in the liver of *S. aurata*.

As for starvation, Usf2 and Gdh mRNA levels followed the same expression pattern after short- and long-term refeeding in the liver of *S. aurata*: a slow but gradual recovery of the values observed in fed fish. Five days of refeeding did not promote significantly higher expression levels than in starved fish for both Usf2 and Gdh. However, 14 days of refeeding allowed restoration of pre-starvation values. Furthermore, Usf2 and Gdh mRNA values in the liver of 14-day refeed fish showed a trend to present slightly higher levels than fed fish. Similarly, long-term refeeding after starvation increased Gdh activity in the liver of *Dicentrarchus labrax* and *Dentex dentex* to values higher than in control fed fish (Pérez-Jiménez *et al.* 2007, 2012). Conceivably, refeeding after long-term starvation may require a long period of adaptation involving enhanced nutrient catabolism to restore metabolic parameters, as pointed out for other key enzymes involved in the intermediary metabolism (Soengas *et al.* 2006; Polakof *et al.* 2007). Therefore, an increased hepatic expression of Gdh may be essential for glutamate deamination and transdeamination of dietary amino acid in long-term refeed fish to provide α -ketoglutarate for the Krebs cycle and supply ATP for energetic demands and biosynthesis.

The fact that *Usf2* mRNA levels showed a complete correlation with *Gdh* expression during starvation and after short- and long-term refeeding suggests that *Usf2* may have a major role in regulating the transcriptional activity of the *glud* gene promoter in the liver of *S. aurata* submitted to changes in the nutritional status. Involvement of *Usf2* in the expression of genes encoding key enzymes in amino acid metabolism, such as *Gdh*, is consistent with previous observations showing transcriptional control of genes related to lipid, carbohydrate and energy metabolism by USF family members in mammals (Shih & Towle 1994; Lefrançois-Martinez *et al.* 1995; Iynedjian 1998; Martin *et al.* 2003; Corre & Galibert 2005; Pawlus *et al.* 2012).

In conclusion, in the present study we report for the first time characterisation of a piscine *glud* gene promoter and provide evidence for a novel regulatory mechanism that links *Usf2* to the nutritional regulation of *glud* transcription in the fish liver.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the AGL2016-78124-R grant (MEC, Spain; cofunded by the European Regional Development Fund, EC).

Author contributions

IVB and IM conceived and designed the study. CG and MCS performed the experiments. CG, IVB and IM analysed the data and edited the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Piscimar (Burriana, Castellón, Spain) for providing *S. aurata* juveniles, the Aquarium of Barcelona (Barcelona, Spain) for supplying filtered seawater, and Dr. B. Viollet (Institut Cochin, France) for providing the *Usf2* expression vector.

Figure

```

-2016 CTGAGAGGAA GACACTCGCC CTC000000CA CATCTTTACA CAAACACACA TAA00000AG CTTTGTATATA GCTCTCTCTG AAATGCTTTC AAGTAAACCC
-1916 CCATTCACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACCACG AATGA00CTCC TGGCC0TAAAT TACACCTTCT CACTTTGGACA CATAAATTGA
-1816 TGC0TTGCAC ACACATCTAC ACAAAACATG CATAAAAAGT AAGGCTGTTC CCAGCACAAT GACATTTCTA TTGCTTTTAT CAAGTACTGT ATCAGTACTA
-1716 GAATGGCACT CAGTAGAGTA CAGTTCATTG GAGATCATGC ATTACTGAAA ATGTTGAAAA ATGACCTTCC TTGCAATTC AAAGAAAGTT TGATAAAATT
-1616 CCGTCC00TT ATCTCGATCC ACACAAAAAG TTTTGGGGGT CTATCTGGA TCGAGACCCA TCAAC00TAC AAGTTTTTAA ACAATTC0TT CAGCAGTGT
-1516 TGTGTAAACA AGTTGACAAA CCAACCAACG GGTGACATTC TACTCGG0CT GATAGAAAA TCAAGTCTTA ATACAGATTG CTCTTCAAG TTTCAGTCA
-1416 AGTCACACAG TGAAGGCCAA ACTGATTTTT GTCAAAACAA ATCGGGAGTA AACAGTTAAT TCTTCAAAAT GCCACATTC ATGTGAAGGC TGTAAAGATT
-1316 CTTTCATTTT TAGCCATGCT AGCAGCTAGC TAGGCTCAAA TAATGACAGT ATCCAGTCCATCCACCAC TTGCTCCAG ACTGAAACAT CTCACAAAC
-1216 ATTGAAGGAA TTGGCATAAA CTTTGACATT CATGGTTCAT CCATTCATCC ATTCATCTAT CAAGTAAAT ATCCAAACAT CTCACAGATG GATTGGCACAA
-1116 ATGTGTGTA GAGACTCATG ATCATTCATG TCTCATTCAG GATGAATTC AATAACTTTC ATGATCC0CT ACACATCCAG TTTTCAAGAA TTCC0TATTT
-1016 GTCAAATACT GAGCTTGGT TTGACTGCTG ATCGACTTAA CAATCACCAG AAGG0CCAGT ATCAAGACTC AAACACAAAC TTCTTACAA ATGGGAC0TT
-916 TGACATTTTA TCTAGGCCA TTATAAGTGC TCAGTTCATC CCATAC0TTG GTTTATGACC AATGCTTCGAAATCCATCCGATTAAG TCGAGTGTAC
-816 AITGTGTTTG GAGCAGCTAG CGAATGTAAA CATGCTAACA CACTAATATG GTGAAATAGG TACATGTTAG CATGCTGTGT ARG0CTCAGA ACAG0CTCAC
-716 AGAGCTCC0G GCTTAATCAT AGGTTTAAAA AAAAAACGTT TTAGTCAAT ATGATATTT TTTAATGGCA GTGTTCAAT GTCAGTTATA TGTGCTGGAA
-616 TACAGAAAT ACAGCTAGAT CAACACAGA TCAAC00CT CATTAATCTG AGCTGTCAT GAGGAACTT AATGCTGAT GCAACACAA AGG0C0TTTT
-516 CAGCAGCTCC CATCTACTC C0CTCTCTC TCTCTCTCT T000CTCATG GCTGTGT0GA CTCACTCAAC AGATCGGGGA ACTGCTGATG ACAGCATGCC
-416 TCATATGAGC AAACGACAAA GTACAAACT GTAACACTGT GGA0G0G0TA CAAAGTAAATGAAATCAAG AGCC0ATGCT C0TCATATCT GCCAGCTTAT
-316 G0TCTACAA AATCAATATAAATAATAT CTACTATAGC AITCAATCT AGTTAGT0G TCGAATTCAT CTCACATAT TTAGGCRAT CATGAAA
-216 TATATCATTT TATATCATTT AAC1TTCC0T TTTCTTACT TTTTCC0CT CATCTTTGAA AACC0ACGGT GGG0ACT0G GAG0G0G0C TGTCAAGTTG
-116 ACAGCAGGG GCGCG0C0CT CTTTCTCTCT C0TCTTCCG GTGAGTCC0G AGGAAC0000 ACTGCTCTCC GCGGCT0G0 CTGCTTTTAAAGCAAAT
-16 ACATGCAATG TCAATGCCA CTCG0CCAGA GGACGGGACA C0G0T0AGGAG CTGCTGTgtc gtttattcta cccccctctt cctgtgtgca cccccattgt
+85 cctgttgtt tagtggcct ttattagtc gtttaacgg ttagctagt ttagtcatg

```

Figure 1

Sequence analysis of the 5'-flanking region of the *S. aurata glud* gene. Chromosome walking allowed isolation of the genomic sequence upstream from the transcription start site of *S. aurata* Gdh, which is shown in capital letters. An arrow indicates the transcription start site. The translation start codon is in boldface and underlined. Putative binding sites for relevant transcription factors are boxed.

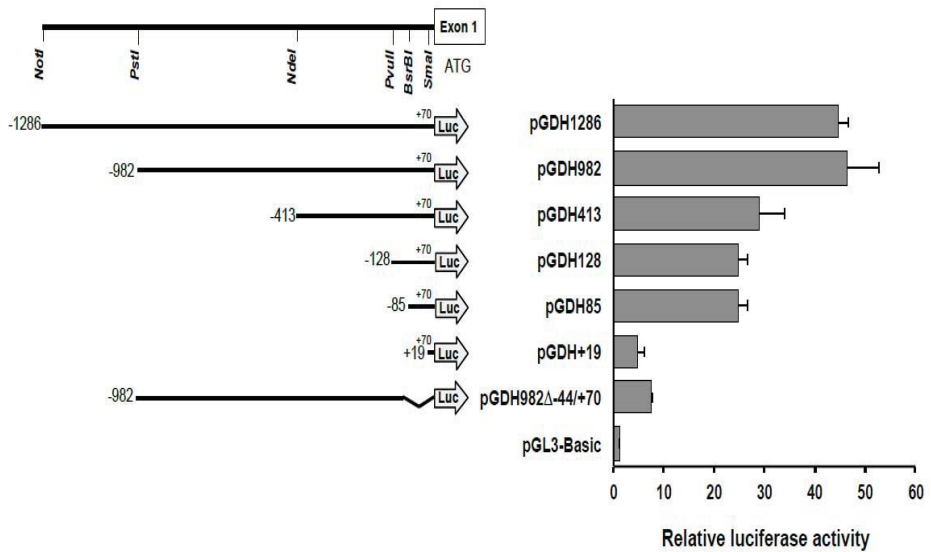


Figure 2

Functional analysis of the 5'-flanking region of *S. aurata glud* in HepG2 cells. The top left part represents the genomic organization of the 5'-flanking region of *S. aurata glud*. Relative position of relevant restriction sites and exon 1 are indicated. Nucleotide numbering starts with +1, which corresponds to the transcriptional start. Reporter constructs having varying 5' ends and identical 3' ends (+70), except for pGDH982Δ-44/+70, were transfected in HepG2 cells along with pCMVβ to normalise for transfection efficiency. Luciferase activity is expressed as fold increase over promoterless reporter plasmid pGL3-Basic. Results shown are the mean ± SD from three independent experiments performed in duplicate.

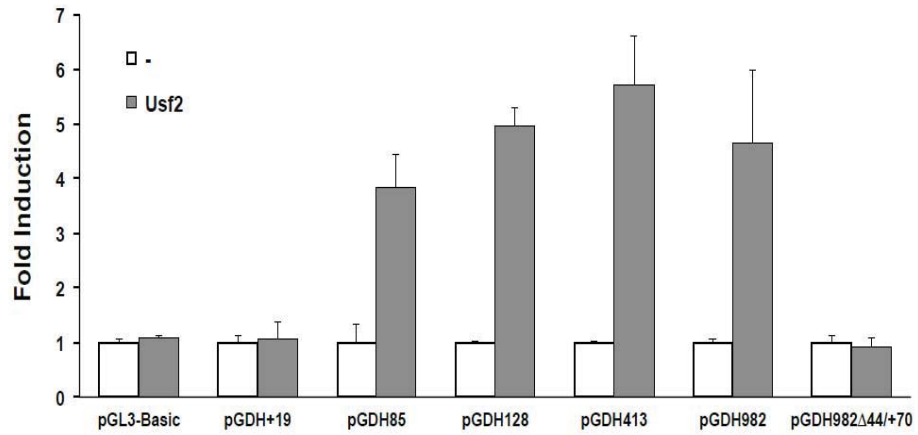


Figure 3

Effect of Usf2 on the promoter activity of *S. aurata glud* gene in HepG2 cells. HepG2 cells were transfected with pGL3-Basic and promoter constructs pGDH+19, pGDH85, pGDH128, pGDH413, pGDH982 or pGDH982Δ44/+70 along with pCMVβ and with or without an expression plasmid encoding Usf2. The promoter activity of the constructs alone was set at 1. Results are presented as mean ± SD values of three independent duplicate experiments.

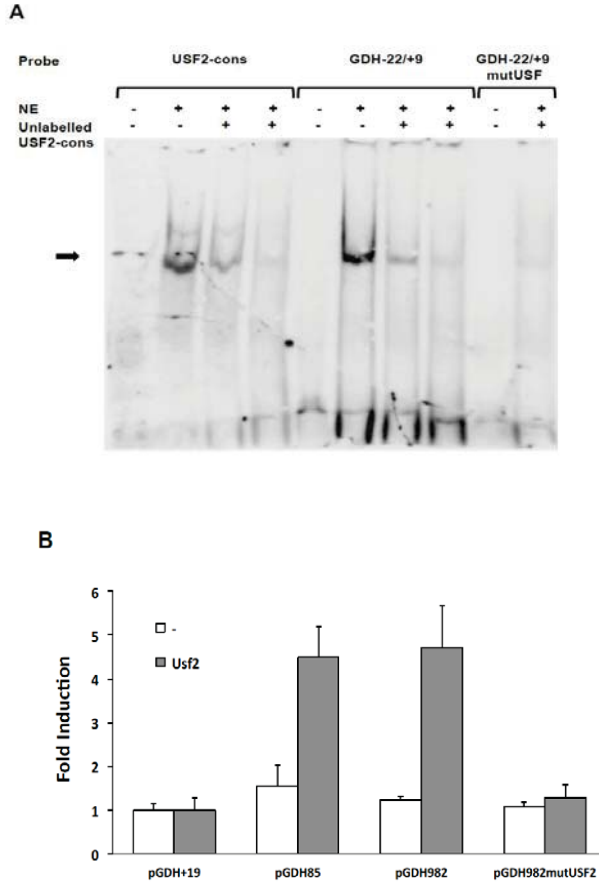


Figure 4

(A) Analysis of USF binding to *glud* promoter by electrophoretic mobility shift assay. To perform a competition analysis, nuclear extracts of HepG2 cells overexpressing Usf2 were incubated with labelled oligonucleotides USF2-cons (lanes 1-4), GDH-22/+9 (lanes 5-8) or GDH-22/+9mutUSF (lanes 9-10). Lanes 1, 5 and 9 contained no extract. Lanes 2 and 6 show binding of nuclear extracts to labelled probes without competitor. Lanes 3 and 7 show competition with 200-fold molar excess of unlabelled double-stranded competitor (USF2-cons). Lanes 4, 8 and 10 show competition with 1000-fold molar excess of unlabelled double-stranded competitor (USF2-cons). DNA-protein complexes are indicated by an arrow. NE, nuclear extracts. (B) Effect of Usf2 on the promoter activity of *glud* containing a mutated E-box. HepG2 cells were transfected with the promoter constructs pGDH+19, pGDH85, pGDH982 or pGDH982mutUsf2, along with pCMV β and with or without an expression plasmid encoding Usf2. The luciferase activity of the reporter constructs alone was set at 1. Results are presented as mean \pm SD values of three independent duplicate experiments.

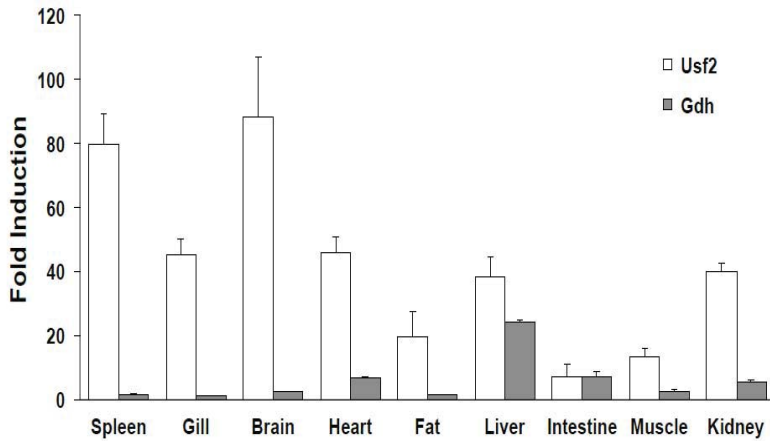


Figure 5

Tissue distribution of Usf2 and Gdh expression in *S. aurata*. RT-qPCR assays of Usf2 and Gdh mRNA levels were performed on total RNA isolated from the spleen, gill, brain, heart, fat, liver, intestine, skeletal muscle and kidney of 18-day fed fish. Expression levels for each gene were normalised using 18S, beta-actin and *EEF1A1* as housekeeping genes. Results are presented as mean \pm SD (n = 4).

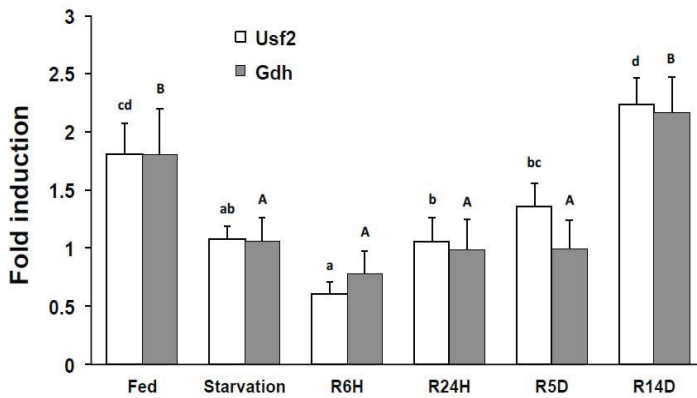


Figure 6

Effect of starvation and refeeding on Usf2 and Gdh mRNA levels in the liver of *S. aurata*. RT-qPCR assays of Usf2 and Gdh mRNA levels were performed on total RNA isolated from the liver of 18-day fed, 19-day starved, and re-fed fish for 6 hours, 24 hours, 5 days and 14 days. Expression levels for each gene were normalised using 18S, beta-actin and *EEF1A1* as housekeeping genes. Results are presented as mean \pm SD (n = 6). Different letters indicate significant differences among conditions ($p < 0.05$).

Table 1 Oligonucleotides used in the present study.

Primer	Sequence (5' to 3')
MC205	GGTATCCACGGTCGTATCTCAGCC
MC206	GAGACCCACATTACCAAAGCCCTG
CG1307	GTCITGTCCTGGAAGCCTGGTGCA
CG1308	GGCTGAGATACGACCGTGGATACCTCCC
CG1315	GACAGGAGAAGGGGGGTAGAATGAACGAC
CG1316	AACAACAAGGACAATGGGGGTGACGACAG
CG1344	<u>CCCCGGG</u> GACACGGTGAGGAGCTGC
CG1345	<u>CCCCGCTC</u> TTCCGCGTGAGTCCCG
CG1342	<u>CCCAGCTG</u> TCAGTTGGACAGCACGG CTCTCCCGGCTCGTGCTGCCTTTTAAAGCAAACCTGACACAG <u>TTTT</u> TCA
CG1552	TTCCCCACTCGGCCAGAGGAC
CG1561	CACCCGGTCATGTGACCTACAC
CG1562	TGTAGGTCACATGACCGGGTGG
CG1563	AAACTGACACAGCATGTCATTCCCCACTCGGC
CG1564	CCGAGTGGGGAATGACATGCTGTGTCAGTTTG
CG1565	AAACTGACACAG <u>TTTT</u> TTCATTCCCCACTCGGC
CG1566	CCGAGTGGGGAATGA <u>AAAA</u> CTGTGTCAGTTTG
CG1543	GGTATTTCCGGGAGCTGCTGAG
CG1544	CGCATCAGGGACGAGGACA
CG1557	AGAGCTGAGGCAAAGCAACC
CG1558	GGGGAGGACGCATTCATAA
AS-EF1Fw	CCCGCCTCTGTTGCCTTCG
AS-EF1Rv	CAGCAGTGTGGTTCCGTTAGC
JDRT18S	TTACGCCCATGTTGCCTGAG
JDRT18AS	AGGATTCTGCATGATGGTCACC
QBACTINF	CTGGCATCACACCTTCTACAACGAG
QBACTINR	GCGGGGGTGTGAAGGTCTC

The following primers contain restriction sites (*underlined*): CG1344 (*Sma*I), CG1345 (*Bsr*BI) and CG1342 (*Pvu*II). *Bold* and *double-underlined* letters indicate site-directed mutations in primers CG1552, CG1565 and CG1566.

References

- Andrews NC & Faller D V 1991 A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **19** 2499.
- Barrosse-Antle M, Su C, Chen P, Boodhansingh KE, Smith TJ, Stanley CA, De León DD & Li C 2017 A severe case of hyperinsulinism due to hemizygous activating mutation of glutamate dehydrogenase. *Pediatric Diabetes*. (doi:10.1111/pedi.12507)
- Bibiano Melo JF, Lundstedt LM, Metón I, Baanante IV & Moraes G 2006 Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **145** 181–187. (doi:S1095-6433(06)00274-1 [pii] 10.1016/j.cbpa.2006.06.007)
- Borges P, Medale F, Dias J & Valente LMP 2013 Protein utilisation and intermediary metabolism of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) as a function of protein:lipid ratio. *British Journal of Nutrition* **109** 1373–1381. (doi:10.1017/S0007114512003418)
- Bundy JG, Iyer NG, Gentile MS, Hu D-E, Kettunen M, Maia A-T, Thorne NP, Brenton JD, Caldas C & Brindle KM 2006 Metabolic consequences of p300 gene deletion in human colon cancer cells. *Cancer Research* **66** 7606–7614. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2999)
- Bunik V, Artiukhov A, Aleshin V & Mkrtchyan G 2016 Multiple Forms of Glutamate Dehydrogenase in Animals: Structural Determinants and Physiological Implications. *Biology* **5** 53. (doi:10.3390/biology5040053)
- Caballero-Solares A, Viegas I, Salgado MC, Siles AM, Sáez A, Metón I, Baanante IV & Fernández F 2015 Diets supplemented with glutamate or glutamine improve protein retention and modulate gene expression of key enzymes of hepatic metabolism in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* **444** 79–87. (doi:10.1016/j.aquaculture.2015.03.025)
- Corre S & Galibert M-D 2005 Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Research* **18** 337–348. (doi:10.1111/j.1600-0749.2005.00262.x)
- Coutinho F, Peres H, Castro C, Pérez-Jiménez A, Pousão-Ferreira P, Oliva-Teles A & Enes P 2016 Metabolic responses to dietary protein/carbohydrate ratios in zebra sea bream (*Diplodus cervinus*, Lowe, 1838) juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* **42** 343–352. (doi:10.1007/s10695-015-0142-x)
- Das AT, Arnberg AC, Malingré H, Moerer P, Charles R, Moorman AF & Lamers WH 1993 Isolation and characterization of the rat gene encoding glutamate dehydrogenase. *FEBS Journal* **211** 795–803.
- Fernández F, Miquel AG, Cordoba M, Varas M, Metón I, Caseras A & Baanante IV 2007 Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **343** 1–10. (doi:10.1016/j.jembe.2006.10.057)
- Figueiredo-Silva AC, Corraze G, Kaushik S, Peleteiro JB & Valente LMP 2010 Modulation of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) intermediary metabolic pathways by dispensable amino acids. *Amino Acids* **39** 1401–1416. (doi:10.1007/s00726-010-0599-y)
- Frick NT, Bystriansky JS, Ip YK, Chew SF & Ballantyne JS 2008 Carbohydrate and amino acid metabolism in fasting and aestivating African lungfish (*Protopterus dolloi*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **151** 85–92. (doi:10.1016/j.cbpa.2008.06.003)
- Fujimi TJ & Aruga J 2008 Upstream stimulatory factors, USF1 and USF2 are differentially expressed during *Xenopus* embryonic development. *Gene Expression Patterns* **8** 376–381. (doi:10.1016/j.gep.2008.05.003)
- Göhring I & Mulder H 2012 Glutamate dehydrogenase, insulin secretion, and type 2 diabetes: a new means to protect the pancreatic β -cell? *Journal of Endocrinology* **212** 239–242. (doi:10.1530/JOE-11-0481)

- Gómez-Requeni P, Mingarro M, Kirchner S, Calduch-Giner J., Médale F, Corraze G, Panserat S, Martin SAM, Houlihan DF, Kaushik SJ *et al.* 2003 Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **220** 749–767. (doi:10.1016/S0044-8486(02)00654-3)
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G *et al.* 2006 SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* **126** 941–954. (doi:10.1016/j.cell.2006.06.057)
- Hardin-Pouzet H, Giraudon P, Belin MF & Didier-Bazes M 1996 Glucocorticoid upregulation of glutamate dehydrogenase gene expression in vitro in astrocytes. *Brain Research. Molecular Brain Research* **37** 324–328.
- Horbach T, Chi TF, Götz C, Sharma S, Juffer AH, Dimova EY & Kietzmann T 2014 GSK3 β -Dependent Phosphorylation Alters DNA Binding, Transactivity and Half-Life of the Transcription Factor USF2. *PLoS ONE* **9** e107914. (doi:10.1371/journal.pone.0107914)
- Iynedjian PB 1998 Identification of upstream stimulatory factor as transcriptional activator of the liver promoter of the glucokinase gene. *Biochemical Journal* **333** (Pt 3) 705–712.
- Karaca M, Frigerio F & Maechler P 2011 From pancreatic islets to central nervous system, the importance of glutamate dehydrogenase for the control of energy homeostasis. *Neurochemistry International* **59** 510–517. (doi:10.1016/j.neuint.2011.03.024)
- Kaushik SJ & Seiliez I 2010 Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquaculture Research* **41** 322–332. (doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02174.x)
- Lefrançois-Martinez AM, Martínez A, Antoine B, Raymondjean M & Kahn A 1995 Upstream stimulatory factor proteins are major components of the glucose response complex of the L-type pyruvate kinase gene promoter. *Journal of Biological Chemistry* **270** 2640–2643.
- Li P, Mai K, Trushenski J & Wu G 2009 New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* **37** 43–53. (doi:10.1007/s00726-008-0171-1)
- Li C, Chen P, Palladino A, Narayan S, Russell LK, Sayed S, Xiong G, Chen J, Stokes D, Butt YM *et al.* 2010 Mechanism of hyperinsulinism in short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency involves activation of glutamate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **285** 31806–31818. (doi:10.1074/jbc.M110.123638)
- Li M, Li C, Allen A, Stanley CA & Smith TJ 2014 Glutamate dehydrogenase: structure, allosteric regulation, and role in insulin homeostasis. *Neurochemical Research* **39** 433–445. (doi:10.1007/s11064-013-1173-2)
- Liu Z, Zhou Y, Liu S, Zhong H, Zhang C, Kang X & Liu Y 2012 Characterization and dietary regulation of glutamate dehydrogenase in different ploidy fishes. *Amino Acids* **43** 2339–2348. (doi:10.1007/s00726-012-1313-z)
- Lushchak VI, Husak V V & Storey KB 2008 Regulation of AMP-deaminase activity from white muscle of common carp *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* **149** 362–369. (doi:10.1016/j.cbpb.2007.10.008)
- Martin CC, Svitek CA, Oeser JK, Henderson E, Stein R & O'Brien RM 2003 Upstream stimulatory factor (USF) and neurogenic differentiation/beta-cell E box transactivator 2 (NeuroD/BETA2) contribute to islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic-subunit-related protein (IGRP) gene expression. *Biochemical Journal* **371** 675–686. (doi:10.1042/BJ20021585)
- Metón I, Egea M, Anemaet IG, Fernández F & Baanante IV 2006 Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology* **147** 3446–3456. (doi:10.1210/en.2005-1506)
- Michaelidis TM, Tzimigiorgis G, Moschonas NK & Papamatheakis J 1993 The human glutamate dehydrogenase gene family: gene organization and structural characterization. *Genomics* **16** 150–160. (doi:10.1006/geno.1993.1152)
- Moyano FJ, Cardenete G & de la Higuera M 1991 Nutritive and metabolic utilization of proteins with high glutamic acid content by

- the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **100** 759–762.
- Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC & Curi R 2003 Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function* **21** 1–9. (doi:10.1002/cbf.1003)
- Pawlus MR, Wang L, Ware K & Hu C-J 2012 Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2 α (HIF2 α) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Molecular and Cellular Biology* **32** 4595–4610. (doi:10.1128/MCB.00724-12)
- Peres H & Oliva-Teles A 2006 Protein and Energy Metabolism of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Juveniles and Estimation of Maintenance Requirements. *Fish Physiology and Biochemistry* **31** 23–31. (doi:10.1007/s10695-005-4586-2)
- Pérez-Jiménez A, Guedes MJ, Morales AE & Oliva-Teles A 2007 Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture* **265** 325–335. (doi:10.1016/j.aquaculture.2007.01.021)
- Pérez-Jiménez A, Cardenete G, Hidalgo MC, García-Alcázar A, Abellán E & Morales AE 2012 Metabolic adjustments of Dentex dentex to prolonged starvation and refeeding. *Fish Physiology and Biochemistry* **38** 1145–1157. (doi:10.1007/s10695-011-9600-2)
- Pfaffl MW 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29** e45.
- Plaitakis A, Kalef-Ezra E, Kotzamani D, Zaganas I & Spanaki C 2017 The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology* **6** 11. (doi:10.3390/biology6010011)
- Polakof S, Míguez JM & Soengas JL 2007 Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: dependence on feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **147** 363–374. (doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.009)
- Sánchez-Muros MJ, García-Rejón L, García-Salguero L, de la Higuera M & Lupiáñez JA 1998 Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **30** 55–63. (doi:S1357272597001003 [pii])
- Sandelin A, Alkema W, Engström P, Wasserman WW & Lenhard B 2004 JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research* **32** 91D–94. (doi:10.1093/nar/gkh012)
- Schaefer BC 1995 Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: New Strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning of Full-Length cDNA Ends. *Analytical Biochemistry* **227** 255–273. (doi:10.1006/abio.1995.1279)
- Shi L, Liu S, Nikolic D & Wang S 2008 High glucose levels upregulate upstream stimulatory factor 2 gene transcription in mesangial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **103** 1952–1961. (doi:10.1002/jcb.21585)
- Shih H & Towle HC 1994 Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Context of the CACGTG motif determines the specificity of carbohydrate regulation. *Journal of Biological Chemistry* **269** 9380–9387.
- Sirito M, Lin Q, Maity T & Sawadogo M 1994 Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **22** 427–433.
- Sirito M, Lin Q, Deng JM, Behringer RR & Sawadogo M 1998 Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** 3758–3763.
- Soengas JL, Polakof S, Chen X, Sangiao-Alvarellos S & Moon TW 2006 Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **291** R810–21. (doi:10.1152/ajpregu.00115.2006)
- Spohrer S, Dimova EY, Kietzmann T, Montenarh M & Götz C 2016 The nuclear fraction of protein kinase CK2 binds to the upstream stimulatory factors (USFs) in the absence of DNA. *Cellular Signalling* **28** 23–31. (doi:10.1016/j.cellsig.2015.11.007)
- Tian J, He G, Mai K & Liu C 2015 Effects of postprandial starvation on mRNA expression of endocrine-, amino acid and peptide

- transporter-, and metabolic enzyme-related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiology and Biochemistry* **41** 773–787. (doi:10.1007/s10695-015-0045-x)
- Tranulis MA, Christophersen B, Blom AK & Borrebaek B 1991 Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of starvation and temperature variations. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry* **99** 687–691.
- Treberg JR, Banh S, Pandey U & Weihrauch D 2014 Intertissue differences for the role of glutamate dehydrogenase in metabolism. *Neurochemical Research* **39** 516–526. (doi:10.1007/s11064-013-0998-z)
- Viegas I, Rito J, Jarak I, Leston S, Caballero-Solares A, Metón I, Pardal MA, Baanante IV & Jones JG 2015 Contribution of dietary starch to hepatic and systemic carbohydrate fluxes in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *British Journal of Nutrition* **113** 1345–1354. (doi:10.1017/S0007114515000574)
- Viollet B, Lefrançois-Martinez AM, Henrion A, Kahn A, Raymondjean M & Martinez A 1996 Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms. *Journal of Biological Chemistry* **271** 1405–1415.
- Visavadiya NP, Li Y, Wang S & Xing C-Y 2011 High glucose upregulates upstream stimulatory factor 2 in human renal proximal tubular cells through angiotensin II-dependent activation of CREB. *Nephron. Experimental Nephrology* **117** e62-70. (doi:10.1159/000320594)
- Wang S 2015 Role of upstream stimulatory factor 2 in diabetic nephropathy. *Frontiers in Biology* **10** 221–229. (doi:10.1007/s11515-015-1359-x)

Metabolic effects of knockdown of glutamate dehydrogenase expression in the liver of *Sparus aurata*

Carlos Gaspar^a, Jonás I. Silva-Marrero^a, Anna Fàbregas^b, Montserrat Miñarro^b, Josep R. Ticó^b, Isabel V. Baanante^a and Isidoro Metón^{a,*}

^aSecció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27, 08028 Barcelona, Spain

^bDepartament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, i Físicoquímica, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27, 08028 Barcelona, Spain

Email address of each author:

Carlos Gaspar: jcarg_no@hotmail.com; Jonás I. Silva-Marrero: jonas_ismael@yahoo.com; Anna Fàbregas: afabregas@ferrer.com; Montserrat Miñarro: minarromontse@ub.edu; Josep R. Ticó: jrtico@ub.edu; Isabel V. Baanante: baanantevazquez@ub.edu; Isidoro Metón: imeton@ub.edu

*Corresponding author: Isidoro Metón, Secció de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024521; Fax: +34 934024520; E-mail: imeton@ub.edu

Abstract

By catalysing reversible oxidative deamination of L-glutamate into 2-oxoglutarate, glutamate dehydrogenase (GDH) is an essential enzyme in ammonia detoxification. To increase the current knowledge of GDH function in fish, we studied the effect of GDH silencing on intermediary metabolism in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Isolation and sequencing of GDH cDNA from *S. aurata* revealed a high degree of homology with its vertebrate orthologues and allowed us to design short hairpin RNAs (shRNAs) to knockdown GDH expression. Following validation of shRNA-dependent downregulation of *S. aurata* GDH mRNA levels *in vitro*, chitosan-tripolyphosphate (TPP) nanoparticles complexed with a plasmid encoding a selected shRNA (pCpG-sh2GDH) were produced to analyse the effect of GDH silencing on hepatic metabolism of *S. aurata*. Seventy-two hours after intraperitoneal administration of chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH, GDH expression in the liver was reduced at the levels of mRNA and immunodetectable protein, leading to decreased GDH activity in both oxidative and reductive reactions to about 53-55 % of the values in control fish. GDH silencing decreased glutamate, glutamine and aspartate aminotransferase activity, while increased 2-oxoglutarate content, 2-oxoglutarate dehydrogenase activity and 6-phosphofructo-1-kinase/fructose-1,6-bisphosphatase activity ratio. Our findings show for the first time that knockdown of GDH reduces transdeamination and gluconeogenesis in the fish liver, hindering the use of amino acids as gluconeogenic substrates and enabling the use of dietary carbohydrates to promote a protein sparing effect in feedstuffs supplied to carnivorous fish in culture.

Keywords: Glutamate dehydrogenase; chitosan; gene knockdown; liver; *Sparus aurata*

1. Introduction

Glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.2) plays a major role in amino acid catabolism and ammonia detoxification in the liver and kidneys through the catalysis of reversible oxidative deamination of L-glutamate to form α -ketoglutarate and ammonia using NAD(P)⁺ as cofactor (Lushchak et al., 2008). GDH is a homohexameric enzyme located in the mitochondrial matrix that shows preferential reactivity towards the intramitochondrial NADP(H) pool in both directions of the reaction *in vitro*, and a near-equilibrium reaction with the NAD(H) pool. Flux direction of the reaction catalysed by GDH remains a matter of debate. Nevertheless, the high K_m value of ammonia and NAD⁺/NADH ratio may direct catalysis towards oxidative deamination (Karaca et al., 2011; Treberg et al., 2014). GDH activity is allosterically regulated by a wide array of metabolites in a complex, still not well-understood manner. GTP strongly inhibits GDH, while ADP activates the enzyme activity. GTP binding to GDH is antagonised by phosphate and ADP, but is synergistic with NADH. Leucine and other monocarboxylic acids also activate GDH in mammals, while palmitoyl-CoA and diethylstilbestrol inhibit GDH activity (Li et al., 2014; Plaitakis et al., 2017). Reversible cystein-specific ADP-ribosylation inactivates GDH. Indeed, sirtuin 4 (SIRT4), a mammalian mitochondrial ADP-ribosyltransferase, inhibits GDH activity in pancreatic β -cells and thereby impairs insulin secretion (Haigis et al., 2006). Given that short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (SCHAD) inhibits GDH via protein-protein interaction in the pancreas, where high levels of SCHAD expression are found, it was hypothesised that GDH may be part of a multiprotein complex in the mitochondrion (Li et al., 2010).

It was suggested that glucose-dependent intracellular formation of glutamate by GDH might amplify glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cell (Göhring and Mulder, 2012; Karaca et al., 2011). Albeit the molecular mechanism remains unclear, involvement of GDH in insulin secretion has been emphasised by the fact that loss of allosteric inhibition of GDH disturbs insulin secretion. In this regard, activating mutations of GDH cause the hyperinsulinemia and hyperammonemia syndrome in humans. Three forms of GDH-mediated hyperinsulinism have been identified so far: mutations that abrogate GTP inhibition, and mutations in SIRT4 and SCHAD (Barrosse-Antle et al., 2017; Li et al., 2014). Indeed, overexpression of GDH in mice exaggerates insulin secretion (Carobbio et al., 2004), whereas GDH inhibition in pancreatic β -cells impairs insulin secretion (Carobbio et al., 2009).

In fish, the molecular role of GDH remains largely unexplored. Glutamate is primarily deaminated by GDH in the fish liver leading to concomitant production of ammonia, while in mammals most glutamate is transaminated to aspartate (Peres and Oliva-Teles, 2006). The effect of nutritional status on hepatic GDH seems to depend on both species and diet composition. Fasting increases GDH activity and/or mRNA levels in *Oncorhynchus mykiss*, *Protopterus dolloi*, *Dentex dentex* and *Danio rerio* (Frick et al., 2008; Pérez-Jiménez et al., 2012; Sánchez-Muros et al., 1998; Tian et al., 2015). However, starvation did not affect GDH activity in *Salmo gairdneri* (Tranulis et al., 1991) and decreased GDH expression in *Dicentrarchus labrax* (Pérez-Jiménez et al., 2007). The supply of high-protein diets usually leads to growth stimulation and enhanced GDH activity (Bibiano Melo et al., 2006; Borges et al., 2013; Caballero-Solares et al., 2015; Coutinho et al., 2016; Viegas et al., 2015). High-protein diets increase plasma free amino acids, leading to

enhanced GDH deamination and increased ammonia excretion. In gilthead sea bream (*Sparus aurata*), dietary supplementation with glutamate increases protein retention through a mechanism involving stimulation of hepatic glucose metabolism and down-regulation of GDH mRNA levels and reductive GDH activity (Caballero-Solares et al., 2015), while dietary starch decreases GDH activity (Couto et al., 2008).

To better understand the functional role of GDH in the piscine liver, the goal of the present study was to analyse the metabolic effect resulting from administration of chitosan-tripolyphosphate (TPP) nanoparticles complexed with a short hairpin RNA (shRNA)-expression plasmid to knockdown GDH expression in the liver of *S. aurata*, which is the most cultured marine fish in Europe (FAO Fishery Statistics Web Page, n.d.).

2. Materials and methods

2.1. Rearing procedures

Gilthead seabream (*S. aurata*) juveniles were obtained from Piscimar (Burriana, Castellón, Spain). Fish were maintained at 20 °C in 260-L aquaria supplied with running seawater in a closed system with active pump filters and UV lamps. The photoperiod was a 12 h light, 12 h dark cycle. Acclimation to our facilities and maintenance procedures were as previously described (Fernández et al., 2007). During the experimental procedure fish were fed a diet containing 58.0 % protein, 9.9 % lipids, 15.0 % carbohydrates, 15.4 % ash, 1.7 % moisture and 20.1 kJ/g gross energy. The diet was supplied daily (at 10 a.m.) at a ration size of 40 g/kg body weight

(BW). To analyse the metabolic effect of GDH silencing, fish were intraperitoneally injected with chitosan-TPP nanoparticles alone or complexed with 10 µg/gram BW of either pCpG-sh2GDH or pCpG-siRNA-Scramble (control plasmid that expresses a scramble sequence with no homology with known sequences; InvivoGen, San Diego, CA, USA). Seventy-two hours following treatment, fish were sacrificed by cervical section, liver samples were immediately dissected out, frozen in liquid N₂ and kept at -80 °C until use. To prevent stress, fish were anaesthetised before handling with tricaine methanesulfonate (MS-222) diluted in seawater (1:12,500). All experimental procedures involving fish complied with the guidelines of the University of Barcelona's Animal Welfare Committee and EU Directive 2010/63/EU for animal experiments.

2.2. Molecular cloning of GDH coding domain sequence from *S. aurata*

The full-coding sequence of GDH from *S. aurata* was isolated using gene-specific primers designed from the *S. aurata* GDH partial cDNA sequence with GenBank accession no. **JX073708** and the First Choice RLM-RACE Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following manufacture's instructions. To conduct 5'-RACE assays, two nested rounds of PCR were performed using gene-specific primers CG1307 and CG1308 (Table 1), and 5' RACE Outer and Inner primers (provided with the kit), after treatment of *S. aurata* total RNA with calf intestine alkaline phosphatase, tobacco acid pyrophosphatase, ligation of 5' RACE Adapter (provided with the kit) and RT in the presence of random

decamers. For 3'-RACE, a RT reaction was performed with *S. aurata* total RNA and 3' RACE Adapter (provided by the kit), followed by two rounds of nested PCR using gene-specific primers CG1306 and CG1305 (Table 1), and 3' RACE Outer and Inner primers (provided with the kit). DNA fragments generated by 5'- and 3'-RACE PCR were ligated into pGEM T easy plasmid (Promega, Madison, WI, USA). After transforming *Escherichia coli* competent cells with the resulting constructs, two independent clones of each amplification were fully sequenced on both strands.

The full-coding sequence of *S. aurata* GDH was amplified by RT-PCR using total RNA from the liver of *S. aurata* as template and primer pair CG1333/CG1334 (Table 1). The amplified fragment was ligated into pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) to generate pGEM-GDH. Following transformation of *E. coli* competent cells with pGEM-GDH, two independent clones were fully sequenced on both strands.

2.3. Construction of expression plasmids

To generate pcDNA3-GDH, the coding domain sequence of GDH was amplified by PCR using primer pair CG1526/CG1527 and pGEM-GDH as template. The resulting fragment was digested with *Bam*HI and *Eco*RI and ligated into pcDNA3 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) previously digested with the same enzymes. To obtain pCpG-sh1GDH, pCpG-sh2GDH, pCpG-sh3GDH, pCpG-sh4GDH and pCpG-sh5GDH, oligonucleotide pairs CG1531/CG1532, CG1533/CG1534, CG1535/CG1536, CG1537/CG1538 and CG1539/CG1540 (Table 1), respectively, were mixed at a final concentration of 25 μ M each, heated at 90 °C for 5 min and then cooled down at room temperature. One hundred ng of each double-stranded product were ligated into pCpG-siRNA (InvivoGen, San Diego, CA, USA) previously digested with *Hind*III and *Acc*65I. shRNA sequences were designed using siRNA Wizard software (InvivoGen, San Diego, CA, USA).

2.4. Preparation of chitosan-TPP-DNA nanoparticles

To silence GDH expression *in vivo*, chitosan-TPP nanoparticles complexed with pCpG-siRNA-Scramble or pCpG-sh2GDH were prepared following a modified version of the ionic gelation method (Calvo et al., 1997). In brief, low molecular weight chitosan (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was dissolved under vigorous magnetic stirring in acetate buffer solution (pH 5.0) at a final concentration of 2 mg/ml. After filtering the solution to remove traces of undissolved chitosan, three-hundred μ g of pCpG-siRNA-Scramble or pCpG-sh2GDH were added to 1.2 ml of 0.84 mg/ml TPP (Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, Spain). The resulting TPP-DNA solutions were added dropwise to 3 ml of chitosan-acetate buffer solution (1:0.4 chitosan/TPP ratio) as previously described (González et al., 2016). Chitosan-TPP-DNA nanoparticles were pelleted by centrifugation (10,000 g at 15 °C for 10 min), gently rinsed twice with ultrapure water and resuspended through vortex shaking in 2 ml of 2 % w/v mannitol to cryoprotect nanoparticles during lyophilisation. After a freeze-drying process at -47 °C, a secondary drying step was performed at 25 °C to remove residual not frozen water. Aliquoted samples were resuspended in 0.5 ml of 0.9 % NaCl previous administration of chitosan-TPP-DNA nanoparticles to *S. aurata*.

2.5. Characterisation of chitosan-TPP-DNA nanoparticles

Chitosan-TPP-DNA nanoparticles were morphologically characterised by means of atomic force microscopy using peak force tapping mode (Multimode 8 AFM attached to a Nanoscope III Electronics, Bruker, USA). Z potential, as a measure of surface charge, was determined using laser Doppler microelectrophoresis in a Zetasizer NanoZ equipped with DTS1060 capillary cells (Malvern Instruments, Malvern, UK).

2.6. Cell culture and transfection

HepG2 cells (ATCC HB 8065) were cultured in Dulbecco's modified Eagles's medium (D-MEM), supplemented with 2 mM glutamine, 110 mg/l sodium pyruvate, 10% foetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were grown at 37 °C in 5 % CO₂ in six-well plates. The calcium phosphate coprecipitation method (Graham and van der Eb, 1973) was used for transient transfection of HepG2 at 45-50 % confluence with 30-300 ng pcDNA3-GDH, 600 ng of either pCpG-siRNA-Scramble or GDH-specific shRNA expression pCpG constructs, and 300 ng pCMV-β (*lacZ*) to correct for variations in transfection efficiency. To ensure equal DNA amounts, empty plasmids were added to each transfection. Forty-eight hours after transfection, the cells were harvested, washed in PBS, lysed and used to isolate total RNA by means of High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland). The activity of β-galactosidase activity in 20-50 µl of the clear lysate was measured as described elsewhere (Metón et al., 2006).

2.7. Quantitative real-time RT-PCR

One µg of total RNA isolated from HepG2 cells or *S. aurata* liver was reverse-transcribed to cDNA using Moloney murine leukaemia virus RT (Life technologies, Carsbad, CA, USA) for 1 h at 37 °C and random hexamer primers. *S. aurata* GDH mRNA levels were determined in a Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a 20-µl mixture containing 0.4 µM of each primer, 10 µl of SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and 1.6 µl of diluted cDNA. The temperature cycle protocol for amplification was 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles with 95 °C for 15 s and 62 °C for 1 min. A dissociation curve was run after each experiment to confirm amplification of one product only. Specificity of the amplification was assayed by amplicon sequencing at least once for each gene. Standard curves were generated with serial dilutions of control cDNA to assay the efficiency of PCR reaction for both genes. Amplicon size was checked by agarose gel electrophoresis. *S. aurata* GDH mRNA levels were assayed using primers CG1543 and CG1544 (Table 1). The expression of *S. aurata* GDH in transiently transfected HepG2 cells was normalised with ribosomal subunit 18s (primer pair MC109/MC110; Table 1) and β-galactosidase (primer pair JDRTCMVBS/JDRTCMVBAS; Table 1) to correct for variations in transfection efficiency. For *in vivo* experiments, the amount of mRNA for the gene of interest in each sample was normalised with *S. aurata* ribosomal subunit 18s, β-actin and elongation factor 1 α (EF1α) as endogenous controls using primer pairs JDRT18S/JDRT18AS,

QBACTINF/QBACTINR and AS-EF1Fw/AS-EF1Rv, respectively (Table 1). Variations in gene expression were calculated by the standard $\Delta\Delta C_T$ method (Pfaffl, 2001).

2.8. Western blotting analysis

Fifty μg of liver protein extract per lane was loaded in a 10% SDS-PAGE gel. After electrophoresis, the gel was equilibrated in transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20 % methanol, pH 8.3) and electroeluted onto a polyvinylidene fluoride membrane (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) for 3 hours at 60 V and 4 °C. After incubation in blocking buffer (non-fat skim milk powder 5 % w/v, 50 mM Tris-base pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 % Tween 20), the membrane was exposed to rabbit anti-GDH (OriGene, Rockville, MD, USA) and mouse anti-actin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) as primary antibodies (1:1000). Immunodetection was performed using an alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA; 1:3000) and the Clarity Western ECL Substrate Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.9. Enzyme activity assays and metabolite determinations

To obtain liver crude extracts for enzyme activity assays, powdered frozen tissue was homogenised (1:5, w/v) in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol and 250 mM sucrose using a PTA-7 Polytron (Kinematica GmbH, Littau-Luzern, Switzerland) (position 3, 30 s). After centrifugation at 20,000 g for 30 min at 4 °C, the supernatant was collected and used to determine enzyme activities. GDH was assayed in the direction of L-glutamate formation (reductive reaction) by monitoring NADH oxidation at 340 nm in a 250- μl mixture containing 50 mM imidazole-HCl pH 7.4, 250 mM ammonium acetate, 5 mM 2-oxoglutaric acid, 0.1 mM NADH, 1 mM ADP and 4 μl crude extract. To determine GDH reaction in the direction of 2-oxoglutaric acid formation (oxidative reaction), NADH formation was followed at 340 nm in a 200- μl assay containing 154 mM tris-HCl pH 9.0, 20 mM L-glutamate, 100 mM hydrazine, 1 mM NAD^+ , 1 mM ADP and 4 μl crude extract. 2-Oxoglutarate dehydrogenase (OGDH; *EC* 1.2.4.2) activity was assayed in a final volume of 200 μl containing 50 mM phosphate buffer pH 7.4, 2 mM MgCl_2 , 0.6 mM thiamine pyrophosphate, 2 mM NAD^+ , 10 mM 2-oxoglutaric acid, 0.2 mM EGTA, 0.4 mM ADP and 4 μl crude extract. OGDH reaction was measured after addition of 0.12 mM coenzyme A. Assays for 6-phosphofructo-1-kinase (PFK; *EC* 2.7.1.11) and fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1; *EC* 3.1.3.11) were previously described (Metón et al., 1999). Alanine aminotransferase (ALT; *EC* 2.6.1.2) and aspartate aminotransferase (AST; *EC* 2.6.1.1) were determined using commercial kits (Linear Chemicals, Montgat, Barcelona, Spain). Enzyme activities are expressed per mg of soluble protein (specific activity). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme necessary to transform 1 μmol of substrate per min. Total protein in liver crude extracts was determined using the Bradford method with bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976). 2-oxoglutaric acid was determined by monitoring NADH oxidation at 340 nm in a 200- μl assay containing 50 mM imidazole-HCl pH 7.4, 0.1 mM NADH, 0.37 U/mL GDH and 75 μl liver trichloroacetic acid extract. Trichloroacetic acid extracts were obtained after homogenisation of powdered frozen liver in 1 M-

trichloroacetic acid (1:10, w/v) followed by centrifugation at 10,000 *g* for 30 min and neutralisation with KOH. All spectrophotometric determinations were performed at 30 °C in a Cobas Mira S analyser (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland).

2.10. Amino acid analysis

Liver trichloroacetic acid extracts were filtered and neutralised with NaOH. Composition of amino acids and related molecules was analysed by cation-exchange chromatography followed by post-column derivatisation with ninhydrin and UV/VIS detection (Moore et al., 1958). Chromatographic separation was performed using a Biochrom 30 amino acid analyser equipped with PEEK column packed with Ultropac cation-exchange resin (Lithium High Performance Physiological Column) and Peltier heating/cooling system (Biochrom, Cambridge, UK). Following injection of samples, a gradient elution was applied with a combination of five lithium citrate buffers of increasing pH (2.80 – 3.55) and ionic strength (0.2 M- 1.65 M) (Biochrom, Cambridge, UK). Column effluents reacted with ninhydrin in a reaction coil with temperature control at 135 °C and derivatised amino acids were detected colorimetrically at 570 nm and 440 nm wavelengths. Amino acid peaks were identified according to the retention times of corresponding amino acid standards (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The amount of each amino acid was calculated by the internal standard method using area responses of analytes and L-norleucine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), which was added to each sample as internal standard. Data acquisition and treatment was performed by means of EZChrom Elite software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

2.11. Statistics

Data were analysed by using a computer program (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA). Statistical analysis with two levels was determined using Student's *t* test. One-way ANOVA statistical differences among three or more levels were determined with the Bonferroni post hoc test.

3. Results

3.1. Molecular cloning of the full-coding sequence of *S. aurata* GDH

A 2,715 bp cDNA encoding GDH was isolated by RACE PCR starting from total RNA isolated from the liver of *S. aurata*. The nucleotide sequence reported for *S. aurata* GDH was deposited in the GenBank Nucleotide Sequence Databases under accession no. **MF459045**. The 2,715-bp GDH cDNA contains a 1,629-bp open reading frame (ORF) and a consensus polyadenylation signal (AATAAA) 20 bp upstream from the GDH poly(A⁺) tail. The deduced amino acid sequence of *S. aurata* GDH predicts a polypeptide of 542 amino acids with a calculated molecular mass of 59.67 kDa. Computer analysis with TargetP 1.1 (Emanuelsson et al., 2000; Nielsen et al., 1997) pointed to a high probability for GDH cDNA to encode a protein that localizes to mitochondrion, containing a mitochondrial targeting peptide with

putative cleavage site at position 20. The inferred amino acid sequence of *S. aurata* GDH was aligned with GDH orthologues in other vertebrates to explore evolutionary relationships (Fig. 1a). *S. aurata* GDH retains all residues considered important for glutamate and GTP binding (15 and 16 residues, respectively) and most of amino acids involved in NAD⁺ (20 out of 25), ADP (26 out of 27) and thiamine pyrophosphate (5 out of 6) binding (Bunik et al., 2016). Pair-wise alignments allowed us to generate a phylogenetic tree (Fig. 1b). Amongst fish, *S. aurata* GDH showed higher similarity with GDH amino acid sequences reported for *Lates calcarifer*, *Nothobranchius furzeri*, *Paralichthys olivaceus* and *Xiphophorus maculatus* (96.3-97.1 % of identity). A lower identity was observed when compared to *Salmo salar* (92.6 %) and *Danio rerio* (87.5 %). In regard with mammalian orthologues, *S. aurata* GDH shared 81.2-84.3 % amino acid identity with *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* and *Homo sapiens* GDH.

3.2. Validation of shRNA expression constructs to silence *S. aurata* GDH in HepG2 cells

Five shRNA (named sh1 to sh5) were designed to knockdown the expression of *S. aurata* GDH and subcloned into pCpG-siRNA (InvivoGen, San Diego, CA, USA), a vector that allows long lasting expression of small interfering RNA (siRNA) *in vivo* as the plasmid does not induce inflammatory responses and gene silencing by methylation in vertebrate hosts. Efficiency of GDH silencing for the resulting constructs (pCpG-sh1GDH to pCpG-sh5GDH) was validated in HepG2 cells co-transfected with 30 ng or 300 ng of a construct expressing *S. aurata* GDH (pcDNA3-GDH) together with 600 ng of pCpG-sh1GDH, pCpG-sh2GDH, pCpG-sh3GDH, pCpG-sh4GDH, pCpG-sh5GDH or pCpG-siRNA-Scramble (control), and 300 ng of pCMV- β as an internal control for transfection efficiency. Forty-eight h later, the cells were lysed and RNA isolated to perform a RT-qPCR assay to determine *S. aurata* GDH mRNA levels. As shown in Figure 2, three shRNAs (sh2, sh3 and sh5) significantly reduced GDH expression in HepG2 cells co-transfected with 30 ng of pcDNA3-GDH, while sh2 was the only shRNA that promoted a significant reduction of GDH mRNA levels in the cells co-transfected with a higher concentration of pcDNA3-GDH (300 ng). In all cases, the highest GDH gene silencing effect was observed using sh2. Co-transfection of pCpG-sh2GDH and 30 ng of pcDNA3-GDH reduced GDH mRNA levels to about 21 % of the values observed in control cells (Scramble), whereas co-transfection of pCpG-sh2GDH and 300 ng of pcDNA3-GDH decreased GDH expression to about 55 %. Therefore, sh2 was selected to perform subsequent studies.

3.3. Effect of chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH administration on GDH expression in the liver of *S. aurata*

To study the metabolic effects resulting from GDH silencing in the liver of *S. aurata*, chitosan-TPP nanoparticles were complexed with pCpG-sh2GDH to deliver and express sh2 into *S. aurata* liver cells. Atomic force microscopy of chitosan-TPP nanoparticles showed a rounded morphology with mean diameter size \pm SD of 224.0 nm \pm 62.3 (n=6) (Fig. 3), and presented a mean Z potential of 33,0 mV \pm 1,2 (n=6). Three groups of fish received an intraperitoneal injection of chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH (10 μ g of plasmid per gram BW), chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble (10 μ g of plasmid per gram BW; negative control) or chitosan-TPP nanoparticles (negative control of chitosan-TPP not complexed with DNA).

Seventy-two h following treatment, the liver was excised and total RNA was isolated. GDH mRNA levels, immunodetectable GDH protein and GDH enzyme activity were determined in the liver of treated fish. Consistent with the use of a scramble sequence with no homology with known sequences, the inclusion of pCpG-siRNA-Scramble in chitosan-TPP nanoparticles did not affect GDH mRNA levels in the liver of *S. aurata*. However, administration of chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH significantly decreased GDH expression to about 41 % of the values found in control animals (Scramble) (Fig. 3). Consistent with sh2-mediated down-regulation of GDH mRNA levels, administration of pCpG-sh2GDH decreased immunodetectable GDH protein levels in liver crude extracts (Fig. 4a), and reduced GDH enzyme activity in both oxidative and reductive reactions to about 53-55 % of the values observed in control animals (Fig. 4b).

3.4. Effect of GDH knockdown on the hepatic intermediary metabolism of *S. aurata*

The metabolic effects of GDH silencing in the liver of fish treated with chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH were addressed by analysing activity of key enzymes involved in amino acid metabolism, glycolysis-gluconeogenesis and Krebs cycle, 2-oxoglutarate levels and amino acid profile. In regard of enzymes involved in amino acid metabolism, we analysed the effect of GDH silencing on the activity of ALT and AST. Knockdown of GDH resulted in a significant decrease of AST to about 73 % of the levels in control fish. Albeit not significant, the same trend was observed for ALT activity (Fig. 5a). Since the liver plays a major role in glucose homeostasis by regulating the activity of glycolysis and gluconeogenesis, we also addressed the effect of GDH silencing on PFK and FBP1 enzymes that control flux through the fructose-6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphate substrate cycle, a key step in glucose metabolism. GDH knockdown did not affect PFK activity in the liver of *S. aurata*. However, GDH silencing significantly reduced FBP1 activity to about 63 % of the levels found in control fish. Taken together, the PFK/FBP1 ratio increased to about 122 % as a result of GDH silencing (Fig. 5b). The hepatic levels of 2-oxoglutarate, a substrate of the reductive reaction catalysed by GDH, were also greatly affected by GDH silencing. 2-Oxoglutarate levels significantly increased to about 172 % in the liver of *S. aurata* treated with chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH. Given that 2-oxoglutarate is also substrate of OGDH, a key regulatory complex in the Krebs cycle, we analysed OGDH activity in the liver of treated fish. GDH silencing increased OGDH activity to about 135 % (Fig. 6). The fact that GDH exerts a major role in amino acid metabolism and ammonia detoxification in the liver through oxidative deamination of L-glutamate prompted us to analyse changes in the hepatic profile of amino acids and related molecules as a result of GDH silencing. Administration of chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH nanoparticles to *S. aurata* significantly decreased glutamate and glutamine to about 80 % and 64 % of the respective values observed in control fish. Among other amino acids and related metabolites, GDH silencing also decreased α -aminobutyric acid to about 76 % of control values while increased 1.2-fold methionine levels (Table 2).

4. Discussion

Fishmeal is the main protein source in fish farming due to high protein content, adequate amino acid profile, high palatability, lack of antinutrients and the presence of highly unsaturated fatty acids (Olive-

Teles, 2012). Given that a significant proportion of wild fish captures is processed into fishmeal for fish farming, a reduction in the amount of protein in aquafeeds would alleviate dependence on wild fisheries (often overexploited) and the environmental impact of aquaculture (Gormaz et al., 2014; Naylor et al., 2000). Indeed, excess of dietary protein in aquafeeds increases amino acid oxidation, ammonia release and the eutrophication of effluent receiving ecosystems (Grigorakis and Rigos, 2011; Martinez-Porchas and Martinez-Cordova, 2012). Therefore, reduction of fishmeal in feedstuffs and substitution of dietary protein by cheaper nutrients with reduced environmental impact is a challenging trend for sustainable aquaculture (Naylor et al., 2009). However, the metabolic features of fish, particularly carnivorous fish, constrain replacement of dietary protein by other nutrients in aquafeeds. As for *S. aurata*, most species in fish farming are carnivorous. Carnivorous fish use efficiently amino acids for growth and to obtain energy. However, dietary carbohydrate digestion and free sugars are metabolised more slowly than in mammals, and give rise to prolonged hyperglycemia. Therefore, optimal growth of teleost fish requires elevated levels of dietary protein (Moon, 2001; Polakof et al., 2012). The main site of amino acid catabolism is the liver and primarily involves transdeamination, in which the amino group of a variety of amino acids is transferred to 2-oxoglutarate to produce glutamate, which in turn can be deaminated by GDH. Even though GDH is considered a biomarker for protein utilisation and ammonia excretion in fish (Liu et al., 2012), the fact that the molecular role of GDH in fish remains largely unexplored prompted us to study the effect of GDH silencing on intermediary metabolism in the liver of *S. aurata*. To this end, the full length GDH cDNA sequence from *S. aurata* was isolated. Considering that *S. aurata* belongs to the *Percomorphaceae* subdivision of teleostean fish, it is not surprising that alignment of the inferred peptide sequence of *S. aurata* GDH with GDH sequences reported for other fish species gave the highest identity (>96 %) with species of the same subdivision (*Lates calcarifer*, *Nothobranchius furzeri*, *Paralichthys olivaceus* and *Xiphophorus maculatus*). A slightly lower identity was found when compared to phylogenetically distant fish species, such as *Salmoniformes* (*Salmo salar*) and *Cypriniformes* (*Danio rerio*) (Betancur-R et al., 2013).

S. aurata GDH retains all amino acids involved in glutamate binding and GTP inhibition (31 amino acids in total), and most of the residues considered of importance for NAD⁺ and thiamine pyrophosphate binding, and ADP activation (51 out of 58) (Bunik et al., 2016). Indeed, analysis of non conserved amino acids involved in the catalytic reaction and allosteric regulation of the enzyme activity reveals that 6 out of 7 correspond to conservative mutations. The only significant difference between fish species of the *Percomorphaceae* subdivision (including *S. aurata*) and mammalian GDH resides in the substitution of a serine residue involved in NAD⁺ binding by Gly368 in *S. aurata* GDH. Taken together, the overall similarity with mammalian GDH suggests a high degree of conservation of the structure and conceivably the reaction mechanism during vertebrate evolution.

Availability of *S. aurata* GDH cDNA sequence allowed us to design shRNAs to knockdown GDH expression and analyse the metabolic effects derived from GDH silencing. Validation of five selected shRNAs was performed in HepG2 cells co-transfected with shRNA and *S. aurata* GDH expression plasmids. The most effective shRNA *in vitro* (sh2) was subsequently chosen to evaluate metabolic effects of GDH gene silencing *in vivo*. As a vector to deliver pCpG-sh2GDH (sh2 expression plasmid) into *S. aurata* hepatocytes, we made use of chitosan, which is a cationic polymer composed of glucosamine and N-acetylglucosamine, derived from chitin by deacetylation. Mucoadhesion, low toxicity, biodegradability

and biocompatibility of chitosan led in recent years to increasing use of chitosan as a carrier to facilitate incorporation of DNA constructs into host cells *in vivo* (Ragelle et al., 2014; Sáez et al., 2017). We recently silenced cytosolic alanine aminotransferase (cALT) expression in the liver of *S. aurata* by means of intraperitoneal administration of chitosan-TPP nanoparticles complexed with a plasmid expressing a shRNA to knockdown *S. aurata* cALT. cALT silencing enhanced rate-limiting activities of glycolysis while did not affect gluconeogenesis (González et al., 2016). Based on the same methodology, in the present study we used the ionic gelation technique, a method based on interactions between low molecular weight chitosan and polyanions such as TPP (Fàbregas et al., 2013), to encapsulate pCpG-sh2GDH (sh2 expression plasmid) and analyse the effect of GDH silencing on the hepatic metabolism of *S. aurata*. Seventy-two hours following intraperitoneal administration of chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH, GDH expression at mRNA levels, immunodetectable protein and reductive and oxidative enzyme activity were significantly reduced in the liver of treated fish.

Consistent with the liver as the main site for GDH expression in fish (Liu et al., 2012), GDH silencing promoted significant changes on the hepatic levels of GDH substrates and products: glutamate and 2-oxoglutarate. Albeit flux direction of GDH catalysis *in vivo* remains controversial, in the present study knockdown of GDH expression similarly decreased GDH activity in both reductive and oxidative reactions. As a result of GDH silencing, 2-oxoglutarate levels increased in the liver of *S. aurata*. Elevated 2-oxoglutarate values may explain enhancement of OGDH activity, a key enzyme complex of the Krebs cycle. Consistent with increased 2-oxoglutarate levels, a decreased GDH activity led to the opposite effects on the hepatic content of glutamate. Since 2-oxoglutarate can be converted to glutamate by either GDH or transaminases, it is conceivable that low glutamate levels were reinforced by inhibition of ALT and AST, which are considered quantitatively the most important aminotransferases in the piscine liver (Cowey and Walton, 1989). Altogether, our findings point to decreased transaminase activity and reduced transamination resulting from GDH gene silencing in the liver of *S. aurata*. Indeed, given that glutamine can be synthesised from glutamate through the catalytic activity of glutamine synthetase, the low levels of glutamate may be responsible for decreased glutamine values in the liver of fish treated with chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH.

Given that methionine is an essential amino acid in animals, the fact that methionine levels were higher in the liver of fish treated with chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH nanoparticles suggests that GDH silencing decreased methionine metabolism, which in turn may result in reduced α -aminobutyric acid levels. Considering that it was recently reported that high protein diets increase α -aminobutyric acid in humans (Haschke-Becher et al., 2016), the low levels of α -aminobutyric acid in the liver of treated fish can also be a consequence of decreased amino acid metabolism as a result of GDH silencing.

In a context with reduced transaminating capacity as a result of GDH silencing, the use of amino acids for glucogenic and ketogenic substrates, and to produce energy by entering catabolic pathways, can be compromised. In this regard, it is remarkable that GDH knockdown increased PFK/FBP1 activity ratio, which suggests that glycolysis was favoured over gluconeogenesis in the liver of treated fish. This metabolic shift could enhance the use of dietary carbohydrates as fuel for energy production. Our findings are consistent with increased glucose utilisation in cultured mice astrocytes treated with siRNA to

knockdown GDH expression (Pajęcka et al., 2015). The authors concluded that glucose could replace glutamate as energy substrate in GDH-deficient cells on the basis that siRNA-treated astrocytes were able to maintain physiological levels of ATP regardless of GDH expression. Furthermore, consistent with the rise in OGDH complex activity and elevated 2-oxoglutarate levels in the liver of *S. aurata* treated with chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH nanoparticles, GDH deficient astrocytes exhibit an increased glucose metabolism linked to elevated Krebs cycle flux from 2-oxoglutarate to oxaloacetate and up-regulation of anaplerotic pathways such as pyruvate carboxylase to maintain the amount of Krebs cycle intermediates (Nissen et al., 2015). Indeed, transgenic mice expressing human GDH2 showed a general decrease in oxidative glucose metabolism (Nissen et al., 2017).

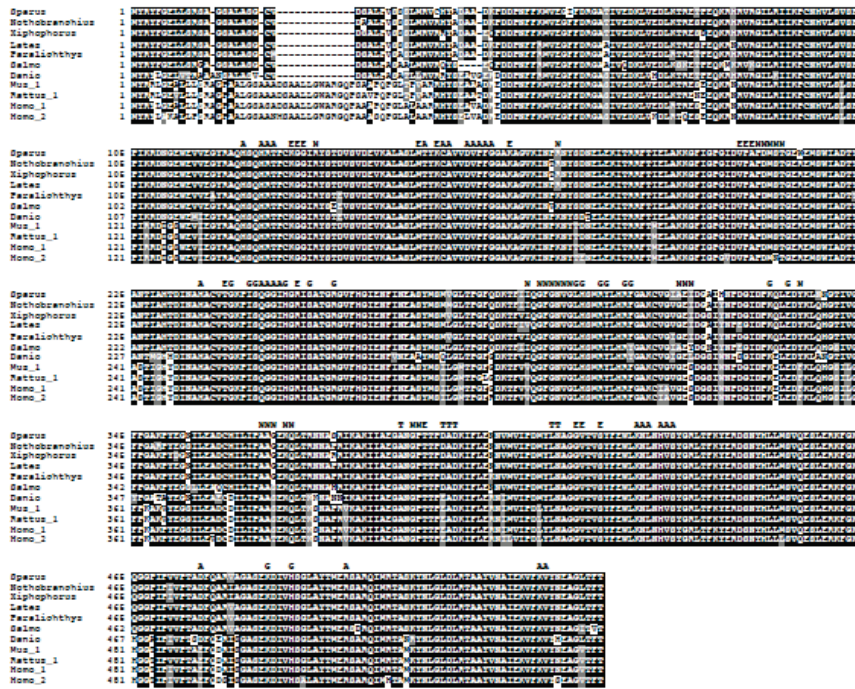
In conclusion, in the present study we addressed the metabolic effects of GDH silencing in the liver of *S. aurata*. Data presented suggest that knockdown of GDH expression reduces hepatic transdeamination and compromises the use of amino acids as gluconeogenic substrates. Our findings point to GDH silencing as a target to stimulate glucose metabolism and the use of dietary carbohydrates in carnivorous fish.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad of Spain (grant number AGL2016-78124-R; cofunded by the European Regional Development Fund, European Commission). The authors thank Piscimar (Burriana, Castellón, Spain) for providing *S. aurata* juveniles and the Aquarium of Barcelona (Barcelona, Spain) for supplying filtered seawater.

Figure captions

A



B

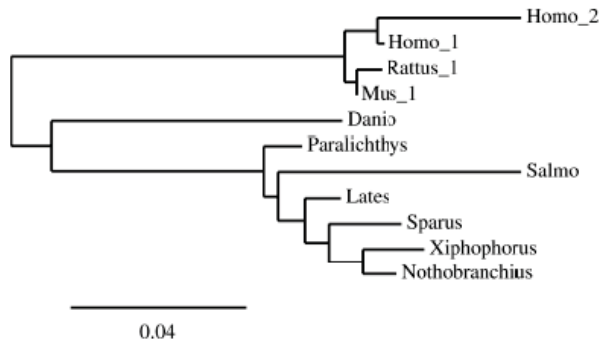


Fig. 1 Multiple alignment and phylogenetic tree of GDH. (A) Multiple alignment of the predicted amino acid sequences for *S. aurata* GDH and GDH orthologues in other fish and mammalian species. Black, identical amino acid residues; grey, conservative amino acid substitutions. Letters on the top indicate amino acid residues involved in the binding of ADP (A), glutamate (E), GTP (G), NAD⁺ (N) and thiamine

pyrophosphate (T). GenBank entries shown are: *Sparus aurata* (MF459045); *Nothobranchius furzeri* (XP_015818399); *Xiphophorus maculatus* (XP_005794695); *Lates calcarifer* (XP_018531054), *Paralichthys olivaceus* (XP_019938702), *Salmo salar* (NP_001117108), *Danio rerio* (NP_997741), *Mus musculus* GDH1 (NP_032159), *Rattus norvegicus* GDH1 (NP_036702), *Homo sapiens* GDH1 (NP_005262) and *Homo sapiens* GDH2 (NP_036216). (B) Phylogenetic tree for GDH. Multiple alignment and phylogenetic tree were made using Clustal Omega (Sievers et al., 2011), PhyML (Guindon et al., 2010), and TreeDyn (Chevenet et al., 2006)

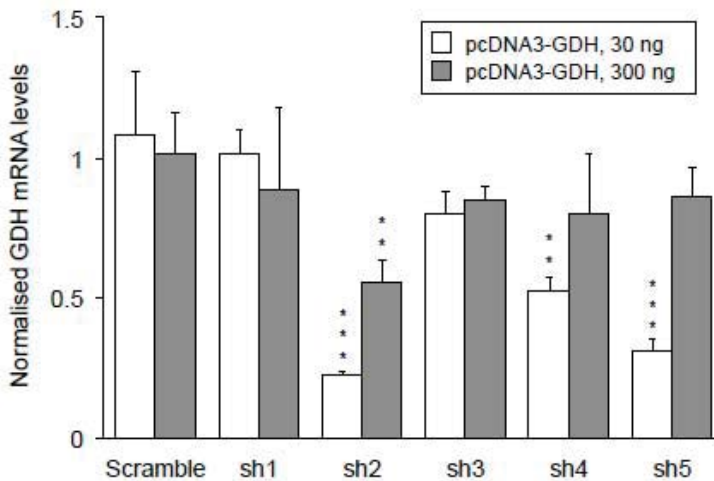


Fig. 2 shRNA-mediated down-regulation of *S. aurata* GDH expressed in HepG2 cells. HepG2 cells grown in 6-well plates were co-transfected with 30 ng or 300 ng of an expression plasmid encoding *S. aurata* GDH (pcDNA3-GDH) together with 600 ng of shRNA expression construct (pCpG-sh1GDH, pCpG-sh2GDH, pCpG-sh3GDH, pCpG-sh4GDH or pCpG-sh5GDH) and 300 ng of pCMV- β . Forty-eight h following transfection, cells were lysed and RNA isolated. Following RT-qPCR, *S. aurata* GDH mRNA levels were normalised with human ribosomal subunit 18s and β -galactosidase (internal control of transfection). The values are expressed as mean \pm SD (n=4). Statistical significance related to control cells (Scramble) is indicated as follows: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

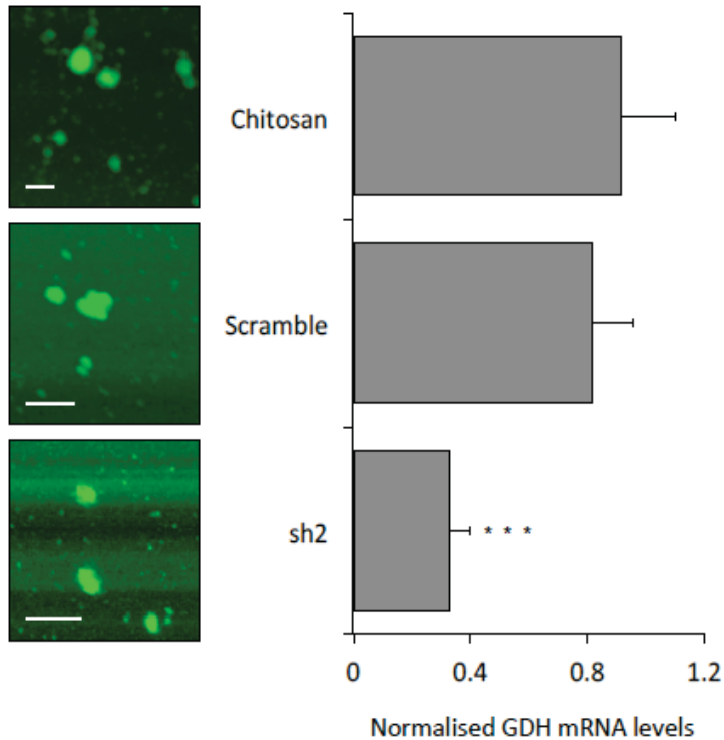


Fig. 3 Atomic force microscopy images of chitosan-TPP-DNA nanoparticles and the effect of nanoparticle administration on GDH expression in the liver of *S. aurata*. The left part of the panel shows representative images of chitosan-TPP, chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble and chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH nanoparticles obtained by atomic force microscopy. White bars correspond to 200 nm. The effect of nanoparticles administration on GDH mRNA levels in the liver of *S. aurata* is shown in the right part of the panel. Three groups of fish were intraperitoneally injected with chitosan-TPP, chitosan-TPP-pCpG-siRNA-Scramble (Scramble; 10 µg of plasmid per gram BW) or chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH (sh2; 10 µg of plasmid per gram BW). Seventy-two hours following treatment, fish were sacrificed and liver samples dissected out. Analysis of GDH mRNA levels relative to the geometric mean of ribosomal subunit 18s, β-actin and EF1α were performed by RT-qPCR in liver samples of *S. aurata*. Expression data represent the mean ± SD (n=6). Statistical significance related to control fish (Scramble) is indicated as follows: *** $P < 0.001$

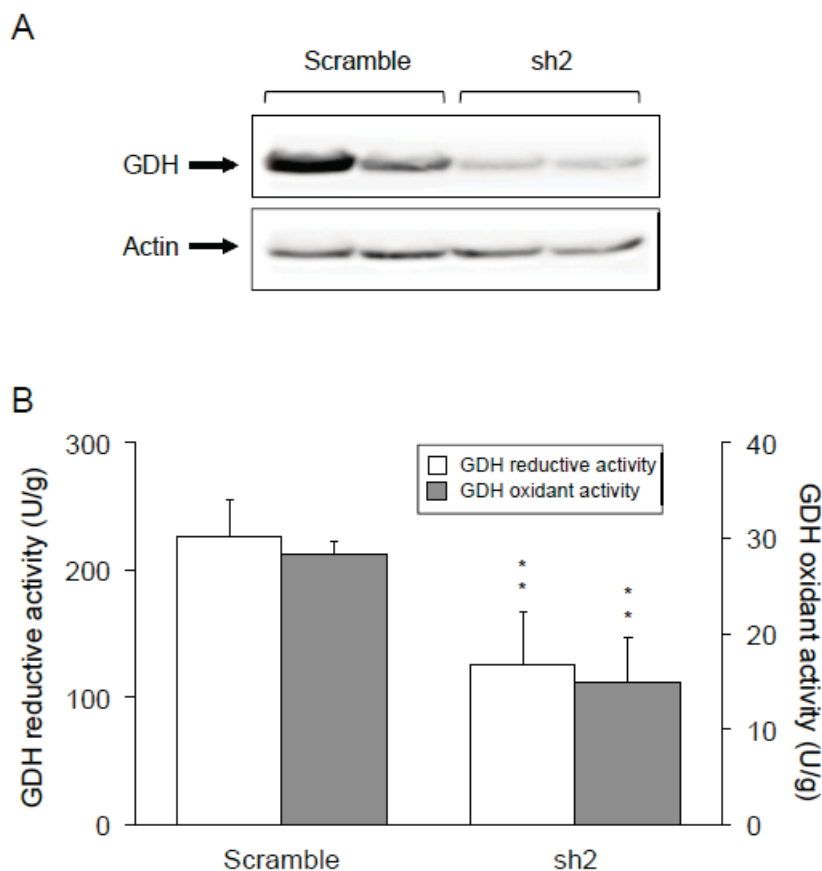


Fig. 4 Effect of chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH administration on GDH immunodetectable levels and enzyme activity in the liver of *S. aurata*. (A) Representative Western blot of immunodetectable GDH protein in liver crude extracts 72 hours after administration of 10 μ g of pCpG-siRNA-Scramble (Scramble) or chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH (sh2) per gram BW. (B) GDH reductive and oxidant specific activity in liver crude extracts 72 hours after administration of 10 μ g of pCpG-siRNA-Scramble (Scramble) or chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH (sh2) per gram BW. Activity values are expressed as mean \pm SD (n=6). Statistical significance related to control fish (Scramble) is indicated as follows: ** $P < 0.01$

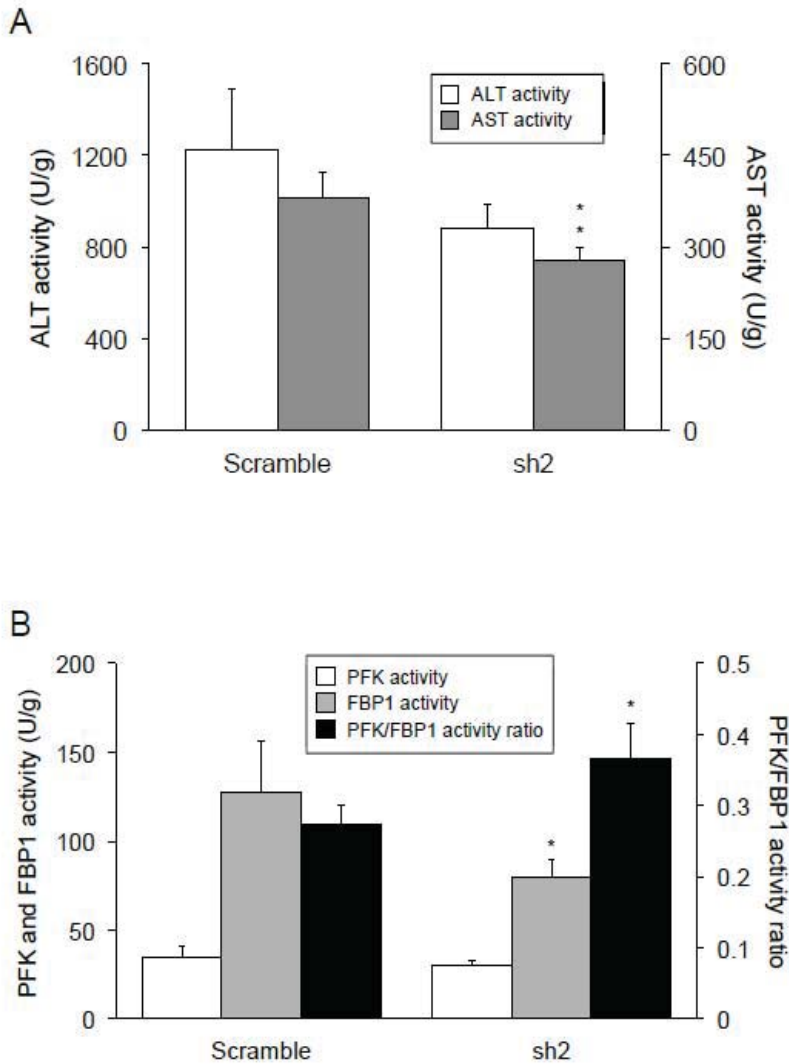


Fig. 5 Effect of GDH silencing on the activity of key enzymes in amino acid metabolism and glycolysis/gluconeogenesis in the liver of *S. aurata*. (A) Effect of GDH silencing on hepatic ALT and AST activity levels. (B) Effect of GDH silencing on hepatic PFK and FBP1 activity, and PFK/FBP1 activity ratio. Enzyme activities were assayed in liver crude extracts 72 hours after administration of 10 μ g of pCpG-siRNA-Scramble (Scramble) or chitosan-TTP-pCpG-sh2GDH (sh2) per gram BW. Activity values are expressed as mean \pm SD (n=6). Statistical significance related to control fish (Scramble) is indicated as follows: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

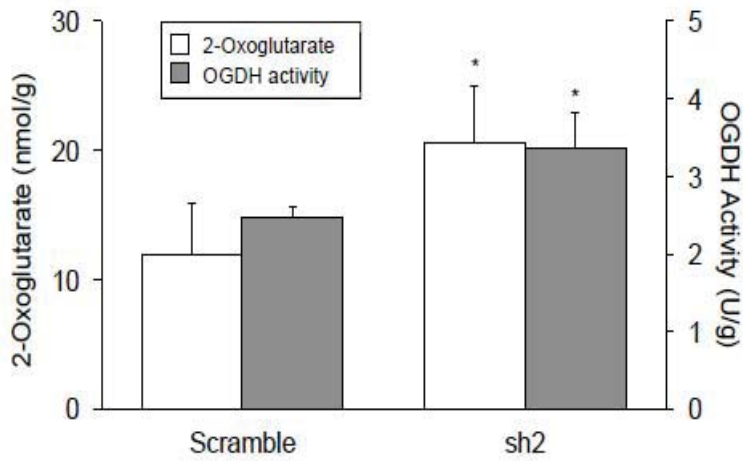


Fig. 6 Effect of GDH silencing on 2-oxoglutarate levels and OGDH activity in the liver of *S. aurata*. 2-Oxoglutarate content and OGDH activity were assayed in liver crude extracts 72 hours after administration of 10 µg of pCpG-siRNA-Scramble (Scramble) or chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH (sh2) per gram BW. The values are expressed as mean ± SD (n=6). Statistical significance related to control fish (Scramble) is indicated as follows: * $P < 0.05$

Table 1. Oligonucleotides used in the present study.

Primer	Sequence (5' to 3')
CG1305	ACTGAATGCTGGTGGTGTGACAGTGT
CG1306	CCCACCACCCAGATGCTGACAAGAT
CG1307	GTCTTGCTCTGGAAGCCTGGTGTCA
CG1308	GGCTGAGATACGACCGTGGATACCTCCC
CG1333	TTCTTAAACACAATTCAACGTCAA
CG1334	GGAGCTGCTGTGTCTGTCAT
CG1526	<u>CCGGATCC</u> ACCATGGACCGGTATTTCCGGGGAG
CG1527	<u>CCGAATTC</u> CGGCTGTTAGAGGGGGAGAATAG
CG1531	GTACCTCGTTCGTTTACACGGTTAGCTATCAAGAGTAGCTAACCGTGTAACGAACCTTTTGGAAA
CG1532	AGCTTTTCCAAAAAGTTCGTTTACACGGTTAGCTACTCTTGATAGCTAACCGTGTAACGAACGAG
CG1533	GTACCTCGCGCATCATCAAGCCCTGTAATCAAGAGTTACAGGGCTTGATGATGCGCTTTTGGAAA
CG1534	AGCTTTTCCAAAAAGCGCATCATCAAGCCCTGTAACCTCTTGATTACAGGGCTTGATGATGCGCGAG
CG1535	GTACCTCGAGCCAAAGCTGGAGTCAAGATCAAGAGTCTTGACTCCAGCTTTGGCTCTTTTGGAAA
CG1536	AGCTTTTCCAAAAAGGCCAAAGCTGGAGTCAAGACTCTTGATCTTGACTCCAGCTTTGGCTCGAG
CG1537	GTACCTCGAGAACAACGTCATGGTTATTTCAAGAGAATAACCATGACGTTGTCTCTTTTGGAAA
CG1538	AGCTTTTCCAAAAAGAGAACAACGTCATGGTTATTTCTTGAAATAACCATGACGTTGTCTCGAG
CG1539	GTACCTCGGCTGGACTTACCTTCACATATCAAGAGTATGTGAAGGTAAGTCCAGCCTTTTGGAAA
CG1540	AGCTTTTCCAAAAAGGCTGGACTTACCTTCACATACTCTTGATATGTGAAGGTAAGTCCAGCCGAG
CG1543	GGTATTTCCGGGAGCTGCTGAG
CG1544	CGCATCAGGGACGAGGACA
AS-EF1Fw	CCCGCCTCTGTTCCTTCG
AS-EF1Rv	CAGCAGTGTGGTTCGGTTAGC
JDRT18S	TTACGCCCATGTTGCTCTGAG
JDRT18AS	AGGATTCTGCATGATGGTCACC
JDRTCMVBS	CCCATTACGGTCAATCCGC
JDRTCMVBAS	ACAACCCGTCGGATTCTCC
QBACTINF	CTGGCATCACACCTTCTACAACGAG
QBACTINR	GCGGGGTGTTGAAGGTCTC

The following primers contain restriction sites (*underlined*): CG1526 (*Bam*HI) and CG1527 (*Eco*RI).

Table 2. Effect of GDH silencing on the levels of amino acid and related molecules in the liver of *S. aurata*.

Metabolite	Scramble (nmol/mg liver)	sh2 (nmol/mg liver)
Taurine	11.96 ± 0.57	12.18 ± 0.80
Urea	2.78 ± 0.45	2.77 ± 0.35
Aspartate	1.90 ± 0.15	2.09 ± 0.17
Threonine	2.54 ± 0.10	3.08 ± 0.68
Serine	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.13
Asparagine	0.28 ± 0.13	0.29 ± 0.11
Glutamate	5.37 ± 0.53	4.30* ± 0.40
Glutamine	1.46 ± 0.16	0.94** ± 0.05
Sarcosine	6.89 ± 1.42	6.48 ± 0.86
Proline	0.52 ± 0.21	0.71 ± 0.08
Glycine	2.33 ± 0.39	2.57 ± 0.54
Alanine	7.94 ± 1.18	7.95 ± 0.70
α -Aminobutyric acid	0.16 ± 0.02	0.12* ± 0.03
Valine	0.14 ± 0.02	0.18 ± 0.03
Methionine	0.13 ± 0.02	0.16* ± 0.02
Cystathionine	0.51 ± 0.09	0.59 ± 0.33
Isoleucine	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Leucine	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.03
Tyrosine	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02
β -Alanine	0.44 ± 0.19	0.41 ± 0.15
Phenylalanine	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.01
Ornithine	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.03
Lysine	0.40 ± 0.07	0.57 ± 0.15
Histidine	0.46 ± 0.08	0.56 ± 0.08
Arginine	0.20 ± 0.03	0.24 ± 0.06

Metabolite levels were assayed in liver crude extracts 72 hours after administration of 10 μ g of pCpG-siRNA-Scramble (Scramble) or chitosan-TPP-pCpG-sh2GDH (sh2) per gram BW. The values are expressed as mean \pm SD (n=5). Statistical significance related to control fish (Scramble) is indicated as follows: * P < 0.05; ** P < 0.01.

References

- Barrosse-Antle, M., Su, C., Chen, P., Boodhansingh, K.E., Smith, T.J., Stanley, C.A., De León, D.D., Li, C., 2017. A severe case of hyperinsulinism due to hemizygous activating mutation of glutamate dehydrogenase. *Pediatr. Diabetes* 18, 911–916.
- Betancur-R, R., Broughton, R.E., Wiley, E.O., Carpenter, K., López, J.A., Li, C., Holcroft, N.I., Arcila, D., Sanciangco, M., Cureton II, J.C., Zhang, F., Buser, T., Campbell, M.A., Ballesteros, J.A., Roa-Varon, A., Willis, S., Borden, W.C., Rowley, T., Reneau, P.C., Hough, D.J., Lu, G., Grande, T., Arratia, G., Ortí, G., 2013. The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLoS Curr* doi:10.1371/currents.tol.53ba26640df0cace75bb165c8c26288
- Bibiano Melo, J.F., Lundstedt, L.M., Metón, I., Baanante, I.V., Moraes, G., 2006. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 145, 181–187.
- Borges, P., Medale, F., Dias, J., Valente, L.M.P., 2013. Protein utilisation and intermediary metabolism of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) as a function of protein:lipid ratio. *Br. J. Nutr.* 109, 1373–1381.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bunik, V., Artiukhov, A., Aleshin, V., Mkrtchyan, G., 2016. Multiple Forms of Glutamate Dehydrogenase in Animals: Structural Determinants and Physiological Implications. *Biology (Basel)*. 5, 53.
- Caballero-Solares, A., Viegas, I., Salgado, M.C., Siles, A.M., Sáez, A., Metón, I., Baanante, I.V., Fernández, F., 2015. Diets supplemented with glutamate or glutamine improve protein retention and modulate gene expression of key enzymes of hepatic metabolism in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 444, 79–87.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63, 125–132.
- Carobbio, S., Frigerio, F., Rubi, B., Vetterli, L., Bloksgaard, M., Gjinovci, A., Pournourmohammadi, S., Herrera, P.L., Reith, W., Mandrup, S., Maechler, P., 2009. Deletion of glutamate dehydrogenase in beta-cells abolishes part of the insulin secretory response not required for glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 284, 921–929.
- Carobbio, S., Ishihara, H., Fernandez-Pascual, S., Bartley, C., Martin-Del-Rio, R., Maechler, P., 2004. Insulin secretion profiles are modified by overexpression of glutamate dehydrogenase in pancreatic islets. *Diabetologia* 47, 266–276.
- Chevenet, F., Brun, C., Bañuls, A.-L., Jacq, B., Christen, R., 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7, 439.
- Coutinho, F., Peres, H., Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2016. Metabolic responses to dietary protein/carbohydrate ratios in zebra sea bream (*Diplodus cervinus*, Lowe, 1838) juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 343–352.
- Couto, A., Enes, P., Peres, H., Oliva-Teles, A., 2008. Effect of water temperature and dietary starch on growth and metabolic utilization of diets in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 151, 45–50.
- Cowey, C.B., Walton, M.J., 1989. Intermediary metabolism, in: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, CA., pp. 260–321.

- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G., 2000. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005–1016.
- Fàbregas, A., Miñarro, M., García-Montoya, E., Pérez-Lozano, P., Carrillo, C., Sarrate, R., Sánchez, N., Ticó, J.R., Suñé-Negre, J.M., 2013. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 446, 199–204.
- FAO Fishery Statistics Web Page, n.d. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/fishery/statistics/en> (accessed 4.11.17).
- Fernández, F., Miquel, A.G., Cordoba, M., Varas, M., Metón, I., Caseras, A., Baanante, I.V., 2007. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 343, 1–10.
- Frick, N.T., Bystriansky, J.S., Ip, Y.K., Chew, S.F., Ballantyne, J.S., 2008. Carbohydrate and amino acid metabolism in fasting and aestivating African lungfish (*Protopterus dolloi*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 151, 85–92.
- Göhring, I., Mulder, H., 2012. Glutamate dehydrogenase, insulin secretion, and type 2 diabetes: a new means to protect the pancreatic β -cell? *J. Endocrinol.* 212, 239–242.
- González, J.D., Silva-Marrero, J.I., Metón, I., Caballero-Solares, A., Viegas, I., Fernández, F., Miñarro, M., Fàbregas, A., Ticó, J.R., Jones, J.G., Baanante, I.V., 2016. Chitosan-Mediated shRNA Knockdown of Cytosolic Alanine Aminotransferase Improves Hepatic Carbohydrate Metabolism. *Mar. Biotechnol.* 18, 85–97.
- Gormaz, J.G., Fry, J.P., Erazo, M., Love, D.C., 2014. Public Health Perspectives on Aquaculture. *Curr. Environ. Heal. reports* 1, 227–238.
- Graham, F.L., van der Eb, A.J., 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456–467.
- Grigorakis, K., Rigos, G., 2011. Aquaculture effects on environmental and public welfare - the case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere* 85, 899–919.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- Haigis, M.C., Mostoslavsky, R., Haigis, K.M., Fahie, K., Christodoulou, D.C., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Karow, M., Blander, G., Wolberger, C., Prolla, T.A., Weindrich, R., Alt, F.W., Guarente, L., 2006. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126, 941–954.
- Haschke-Becher, E., Kainz, A., Bachmann, C., 2016. Reference values of amino acids and of common clinical chemistry in plasma of healthy infants aged 1 and 4 months. *J. Inherit. Metab. Dis.* 39, 25–37.
- Karaca, M., Frigerio, F., Maechler, P., 2011. From pancreatic islets to central nervous system, the importance of glutamate dehydrogenase for the control of energy homeostasis. *Neurochem. Int.* 59, 510–517.

- Li, C., Chen, P., Palladino, A., Narayan, S., Russell, L.K., Sayed, S., Xiong, G., Chen, J., Stokes, D., Butt, Y.M., Jones, P.M., Collins, H.W., Cohen, N.A., Cohen, A.S., Nissim, I., Smith, T.J., Strauss, A.W., Matschinsky, F.M., Bennett, M.J., Stanley, C.A., 2010. Mechanism of hyperinsulinism in short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency involves activation of glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 285, 31806–31818.
- Li, M., Li, C., Allen, A., Stanley, C.A., Smith, T.J., 2014. Glutamate dehydrogenase: structure, allosteric regulation, and role in insulin homeostasis. *Neurochem. Res.* 39, 433–445.
- Liu, Z., Zhou, Y., Liu, S., Zhong, H., Zhang, C., Kang, X., Liu, Y., 2012. Characterization and dietary regulation of glutamate dehydrogenase in different ploidy fishes. *Amino Acids* 43, 2339–2348.
- Lushchak, V.I., Husak, V. V., Storey, K.B., 2008. Regulation of AMP-deaminase activity from white muscle of common carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 149, 362–369.
- Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., 2012. World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. *Sci. World J.* 2012, 389623.
- Metón, I., Egea, M., Anemaet, I.G., Fernández, F., Baanante, I.V., 2006. Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology* 147, 3446–3456.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, E., Fernández, F., Baanante, I.V., 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 82, 223–232.
- Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 243–249.
- Moore, S., Spackman, D.H., Stein, W.H., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Fed. Proc.* 17, 1107–1115.
- Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15103–15110.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10, 1–6.
- Nissen, J.D., Lykke, K., Bryk, J., Stridh, M.H., Zaganas, I., Skytt, D.M., Schousboe, A., Bak, L.K., Enard, W., Pääbo, S., Waagepetersen, H.S., 2017. Expression of the human isoform of glutamate dehydrogenase, hGDH2, augments TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate during glucose deprivation in astrocytes. *Glia* 65, 474–488.
- Nissen, J.D., Pajęcka, K., Stridh, M.H., Skytt, D.M., Waagepetersen, H.S., 2015. Dysfunctional TCA-Cycle Metabolism in Glutamate Dehydrogenase Deficient Astrocytes. *Glia* 63, 2313–2326.
- Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* 35, 83–108.
- Pajęcka, K., Nissen, J.D., Stridh, M.H., Skytt, D.M., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., 2015. Glucose replaces

- glutamate as energy substrate to fuel glutamate uptake in glutamate dehydrogenase-deficient astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 93, 1093–1100.
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 2006. Protein and Energy Metabolism of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Juveniles and Estimation of Maintenance Requirements. *Fish Physiol. Biochem.* 31, 23–31.
- Pérez-Jiménez, A., Cardenete, G., Hidalgo, M.C., García-Alcázar, A., Abellán, E., Morales, A.E., 2012. Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1145–1157.
- Pérez-Jiménez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E., Oliva-Teles, A., 2007. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture* 265, 325–335.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Plaitakis, A., Kalef-Ezra, E., Kotzamani, D., Zaganas, I., Spanaki, C., 2017. The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology (Basel)*. 6, 11.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *J. Comp. Physiol. B.* 182, 1015–1045.
- Ragelle, H., Riva, R., Vandermeulen, G., Naeye, B., Pourcelle, V., Le Duff, C.S., D’Haese, C., Nysten, B., Braeckmans, K., De Smedt, S.C., Jérôme, C., Prétat, V., 2014. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency. *J. Control. Release* 176, 54–63.
- Sáez, M., Vizcaíno, A., Alarcón, F., Martínez, T., 2017. Comparison of lacZ reporter gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following oral or intramuscular administration of plasmid DNA in chitosan nanoparticles. *Aquaculture* 474, 1–10.
- Sánchez-Muros, M.J., García-Rejón, L., García-Salguero, L., de la Higuera, M., Lupiáñez, J.A., 1998. Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 55–63.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
- Tian, J., He, G., Mai, K., Liu, C., 2015. Effects of postprandial starvation on mRNA expression of endocrine-, amino acid and peptide transporter-, and metabolic enzyme-related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiol. Biochem.* 41, 773–787.
- Tranulis, M.A., Christophersen, B., Blom, A.K., Borrebaek, B., 1991. Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effects of starvation and temperature variations. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 99, 687–691.
- Treberg, J.R., Banh, S., Pandey, U., Weihrauch, D., 2014. Intertissue differences for the role of glutamate dehydrogenase in metabolism. *Neurochem. Res.* 39, 516–526.
- Viegas, I., Rito, J., Jarak, I., Leston, S., Caballero-Solares, A., Metón, I., Pardal, M.A., Baanante, I.V., Jones, J.G., 2015. Contribution of dietary starch to hepatic and systemic carbohydrate fluxes in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Br. J. Nutr.* 113, 1345–1354.

